

كلية الكوت الجامعة
مركز البحوث والدراسات والنشر



ISBN: 978-9922-685-15-1

الديدان الخيطية (النيماتودا) الممرضة للحشرات

ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES

تأليف

الدكتور محمد زيدان خلف

رئيس باحثين علميين ، خبير أدارة أفات

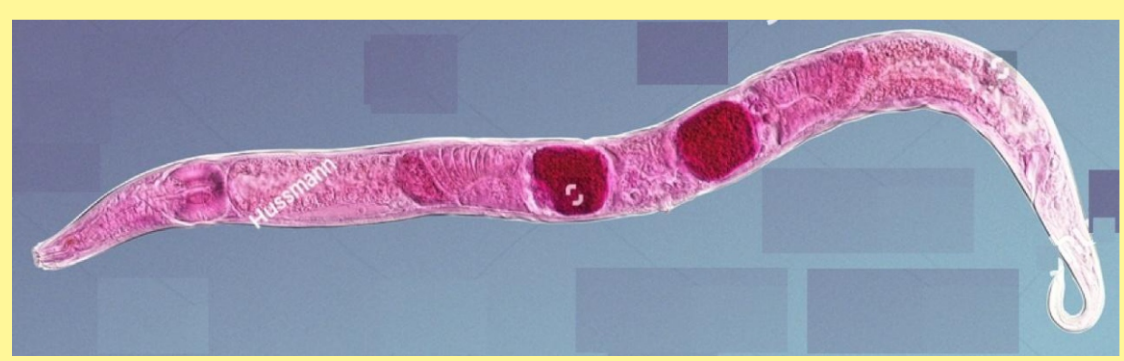












الديدان الخيطية (النيماتودا) الممرضة للحشرات

الدكتور محمد زيدان خلف

تصدير

اهتم مركز الدراسات والبحوث والنشر التابع لكلية الكوت الجامعة بطباعة الكتب العلمية والثقافية ترويجا للمعرفة ولاسيما الاكاديمية منها , ويأتي هذا الكتاب الموسوم بـ((الديدان الخيطية (النيماتودا) المرضة للحشرات)) لمؤلفه الدكتور محمد زيدان خلف ، وقد أوعز السيد رئيس مجلس ادارة الكلية الأستاذ المساعد الدكتور طالب الموسوي بطبعه رفدا للمكتبة العربية ومن اجل افادة الباحثين والتدريسيين والطلبة ونشره بشكل مجاني ورقي والكتروني على مواقع مركز البحوث والدراسات والنشر كلية الكوت الجامعة.

... جزاه الله خيرا به ، وهو ولي التوفيق والسداد





ISBN: 978-9922-685-15-1



كلية الكوت الجامعة

مركز البحوث والدراسات والنشر



الديدان الخيطية (النيماتودا) الممرضة للحشرات

ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES

تأليف

الدكتور محمد زيدان خلف

2022

منشورات
مركز البحوث والدراسات والنشر
كلية الكوت الجامعة



٥/ ٥٩٢

خ ٨٧ خلف ، محمد زيدان
الديدان الخيطية (النيماتودا) المرضة للحشرات
محمدزيدان خلف . - ط ١ - بغداد :
مطبعة الرفاه ، ٢٠٢٢
١٢٠ص ؛ ٢٤سم
١- الديدان الخيطية (الاسطوانية) - أ - العنوان
م.و.

٤٠٣٧/ ٢٠٢٢

المكتبة الوطنية / الفهرسة اثناء النشر

رقم الايداع في دار الكتب والوثائق ببغداد
٤٠٣٧ لسنة ٢٠٢٢ م

الرقم الدولي: ISBN: 978-9922-685-15-1



تحية شكر

تتناثر الكلمات حبراً وحباً..

على صفائح الاوراق ..

لكل من علمني...

ومن أزال غيمة جهل مررت بها...

برياح العلم الطيبة..

ولكل من أعاد رسم ملامحي...

وتصحيح عثراتي..

أبعث تحية شكر وأحترم.

أبدئها بالحمد لله حمدا كثيرا طيبا مبارك فيه لهدايته لنا لرفد المكتبة العربية عموما والعراقية خصوصا لانجاز هذا الجهد العلمي الذي تفتقر اليه مكتباتنا كي يكون متداولا لزملائنا المختصين والمهتمين وابنائنا الطلبة.

الشكر أجزله لكلية الكوت الجامعة متمثلة برئيس مجلس أدارتها الدكتور طالب زيدان الموسوي المحترم في مكرمته لانجاز طبع هذا الكتاب عرفانا منه لحب العلم والمعرفة. أجمل عبارات الشكر لكادر مركز البحوث والدراسات والنشر في كلية الكوت الجامعة والكادر المسؤول عن شؤون الطباعة لهم مني كل التقدير والاحترام. الشكر والمحبة لعائلتي الكريمة لتحملها الحال اثناء فترة الكتابة.

المؤلف

محتويات الكتاب

محتويات الكتاب

المقدمة

النيماتودا (الديدان الخيطية) **Nematodes** هي ديدان مستديرة غير مجزأة، متطاولة عديمة اللون، بدون زوائد، وعادة ماتكون مجهرية، هناك أنواع مفيدة **Benificail Nematodes** وأخرى غير مفيدة **Harmful Nematodes**، تسمى النيماتودا غير المفيدة أيضاً "النيماتودا المتطفلة على النبات" **Plant Parasitic Nematodes** وتتسبب في تلف المحاصيل وأنواع أخرى من النباتات، أما النيماتودا المفيدة فهي تهاجم الآفات الحشرية ألتي تنقلها التربة، ولكنها ليست ضارة بالإنسان أو الحيوانات أو النباتات أو ديدان الأرض، وبالتالي يمكن أستخدامها كعوامل مكافحة أحيائية ضد بعض الآفات الحشرية. يشار إلى النيماتودا (الديدان الخيطية) المفيدة ألتي تسبب المرض داخل حشرة بأسم "ممرضة للحشرات" **Entomopathogenic Nematodes (EPNs)** ولها القدرة على قتل الحشرات.

تم أستغلال النيماتودا (الديدان الخيطية) الممرضة للحشرات (المفيدة) (EPNs) كعوامل للمكافحة الاحيائية منذ النصف الأخير من القرن العشرين، ومع ذلك لايزال هناك الكثير من الأبحاث ألتي يتعين القيام بها لفهم كيفية عمل هذه الكائنات في الزراعة وغيرها من النظم البيئية. ومن الأهمية بمكان معرفة متى وكيف ستكون هذه النيماتودا عوامل مكافحة أحيائية فعالة ومربحة. أستخدمت عدة أنواع من النيماتودا **EPN** بنجاحات متفاوتة للسيطرة على العديد من الآفات الحشرية، كما يمكن أعتبار النيماتودا الممرضة للحشرات (المفيدة) كبديل جيد لأستبدال المبيدات الحشرية الكيميائية التقليدية لمكافحة الآفات الحشرية ويمكن تطبيقها في ساحات المنازل والحدائق وملاعب الجولف والأعشاب والبيوت الخضراء ومزارع العنب وحول خلايا نحل العسل والعديد من المناطق الأخرى المتأثرة بالآفات الحشرية. نظراً لأن النيماتودا هي طفيليات طبيعية لآفات حشرية معينة، فإنها لاتهاجم أو تصيب الكائنات الحية الأخرى مثل الحشرات النافعة كنحل العسل أو الدعاسيق النافعة، بالإضافة إلى ذلك لاتوجد تقارير عن آثارها، فهي لايمكن أن تؤذي الأشخاص اللذين ينتجونها أو الأشخاص اللذين يستخدمونها لمكافحة مشاكل الآفات ولا تسبب أذى للأطفال اللذين يلعبون على الاعشاب ألتي تم أستعمال الديدان الخيطية في مكافحة الافات ألتي تصيبها. ترتبط الديدان الخيطية الممرضة للحشرات أرتباطًا تكافلياً بأنواع معينة من البكتيريا **Species Specific Bacteria** وتسبب المرض للحشرات ألتي تصيبها وتقتلها في غضون 48 ساعة. يعتبر الجنس **(Rhabditida: Rhabditide)** ***Metarhabditis*** ، ***Rhabditida*** و ***Steinernema*** التي تنتمي إلى مجموعة **Bacteriophage** من عوامل المكافحة الأحيائية الممكن أستخدامها بأمان في مكافحة الآفات الحشرية ألتي تهاجم المحاصيل الزراعية والخضراوات وقد أستخدمت للسيطرة على العديد من الآفات الحشرية.

تعتبر النيماتودا (الديدان الخيطية) الممرضة للحشرات **Entomopathogenic Nematodes(EPNs)** أحد العوامل الأحيائية الفعالة ألتي تستخدم في مكافحة مدى واسع من العوائل الحشرية والتي تدخل إلى داخل العائل الحشري من خلال الفتحات الطبيعية كالفم والشرج ومن خلال الفتحات التنفسية الموجودة على جسم الحشرة، تعيش مع هذه الكائنات بكتريا تعايشية تعمل على تحويل أنسجة العائل إلى غذاء جاهز للنيماتودا. هناك دراسات كثيرة أشارت إلى أاستخدام هذه العوامل الأحيائية بنجاح في مكافحة بعض الآفات الاقتصادية. تعتبر الطرائق المستخدمة لمكافحة الآفات الحشرية بأستخدام النيماتودا من الطرائق الأمنة التي لاتوئثر على الحشرات أو الكائنات غير المستهدفة، بالإضافة إلى ذلك فإنه ليس لها أي تأثير سلبي على الإنسان إو البيئة

فهي لاتترك أي أثر متبقي على النباتات. لذلك أستخدمت تلك الطريقة كبديل ناجح في مكافحة بعض الآفات ألحشرية وكذلك أستخدمت بنجاح في برامج المكافحة المتكاملة كعامل أساسي في خفض الكثافة السكانية لبعض الآفات، فضلاً عن إمكانية استخدامها جنباً إلى جنب مع بعض المبيدات الكيميائية من دون التأثير على قابليتها المرضية.

الفصل الاول

تاريخ علم الديدان الخيطية (النيماتودا) الممرضة للحشرات

History of Entomopathogenic Nematology

يتضمن مراجعة تاريخ علم الديدان الخيطية الممرضة للحشرات **Entomopathogenic Nematology (EPN)** أوصافًا لمجموعتي ***Steinernema*** و ***Heterorhabditis***، وكيف تم استخدام علم التشكل فقط للتمييز بين الأنواع من حيث أوصاف البكتيريا التكافلية وتوضيح دورها في معقد النيماتودا والحشرات، بما في ذلك خصائص المضادات الحيوية ومتغيرات الاطوار الحياتية وإعاقة استجابات دفاع المضيف. تشمل الموضوعات الأخرى الحلول المبكرة المتعلقة بالإنتاج والتخزين والتطبيقات الميدانية والمبيعات التجارية الأولى للديدان الخيطية الممرضة للحشرات في أمريكا الشمالية. ركزت الدراسات اللاحقة على كيفية تحديد الديدان الخيطية لعوائلها الحشرية، وتأثيراتها على الكائنات الحية غير المستهدفة، وقابلية الاطوار المعدية للإصابة بميكروبات التربة. في حين أن أهداف الباحثين الأوائل كانت زيادة فعالية الديدان الخيطية الممرضة للحشرات لمكافحة الآفات، كما لوحظ الاستخدام المتزايد للنيماتودا التي تتبع ***Heterorhabditis*** و ***Photorhabdus*** كنماذج وراثية في البيولوجيا الجزيئية.

ترتبط الديدان الخيطية الممرضة للحشرات **EPN** من عائلات ***Steinernematidae*** و ***Heterorhabditidae*** ارتباطًا تكافليًا مع البكتيريا في الأجناس ***Xenorhabdus*** و ***Photorhabdus*** على التوالي. عندما يدخل طور معدي إلى تجويف جسم مضيف حساس يتم إطلاق البكتيريا وتتكاثر ويحدث موت العائل في غضون يومين ومن هنا جاء المصطلح ممرض للحشرات. تتطور الديدان الخيطية **EPN** وتتكاثر داخل جثة الحشرات وتتغذى على البكتيريا التكافلية والأنسجة المتحللة للعائل المضيف. في عام **1923** وصف **Steiner** أول نيماتودا ممرضة للحشرات باسم ***Aplectana kraussei*** والتي تسمى الان ***Steinernema kraussei*** وفي ذلك الوقت لم يكن ذلك أكثر من فضول ضمن عمله في مجال البحث العلمي. في عام **1930** عزلت النيماتودا الممرضة للحشرات **(Steiner 1929)** ***Neoaplectana glaseri*** من قبل **(Glaser and Fox (1930** والتي من غير المؤكد حتى الآن وضعها ضمن عائلة **Oxyuridae** من قبل **Steiner**. في عام **(1955)** وصف **(Jaroslav Weiser, 1955)** مجموعة أوروبية للنيماتودا ***Neoaplectana carpocapsae*** من يرقات عثة التفاح **codling moth** وعزل **(Dutky and Hough, 1955)** سلالة **DD-136** لسلالة ***Steinernematid*** غير موصوفة من يرقات عثة التفاح في شرق أمريكا الشمالية . أن الدراسات الجادة حول الإمراضية وتاريخ حياة الديدان الخيطية الممرضة للحشرات **EPN** بدأت في عام **1965** حيث تم الحصول على مستعمرات ***S. carpocapsae*** من **Weiser** وذلك باستخدام دراسات التشكل والتهجين فتبين أن السلالة التشيكوسلوفاكية من ***S. carpocapsae*** والنيماتودا في أمريكا الشمالية **DD 136** كانت موصوفة **(Poinar، 1967)**. في عام **1955** وصف **Jaroslav Weisr** النيماتودا ***Steinerma carpocapsae*** ضمن وقائع الندوة الدولية لأمراض الحشرات والمكافحة الميكروبية في واشنطن، وكذلك في هولندا عام **1966**. في عام **1965** تم وصف البكتيريا التكافلية تحت اسم

Achromobacter nematophilus المرتبطة تعايشيا بـالنيماتودا *S. carpocapsae* من قبل Poinar and Thomas (1965). تم بعد ذلك توضيح موقع البكتيريا في مراحل الاطوار المعدية Infective stage Juveniles (IJs) باستخدام المجهر الضوئي والمجهر الإلكتروني لاحقًا (Poinar، 1966 ؛ Poinar and Leutenegger، 1968)، وتم توضيح دور البكتيريا في تطوير النيماتودا وموت العائل المضيف (Poinar and Thomas، 1966، 1967) و نقل البكتيريا لاحقًا إلى جنس جديد *Xenorhabdus* . في عام 1965 وصف Gerard Thomas و George Poinar من جامعة كاليفورنيا في بيركلي البكتيريا التكافلية المرتبطة بـالنيماتودا *Steinernema carpocapsae* وكذلك البكتريا *Heterorhabditis bacteriophora* في عام 1979 كشفوا أيضًا عن أهمية البكتيريا في تطور الديدان الخيطية EPN. في البداية، كان استخدام مورفولوجيا ذيل الذكر أو صفات الاطوار المعدية IJs وحدها للتمييز بين الأنواع المختلفة من النيماتودا الممرضة للحشرات التي تتبع الجنس *Steinernema* (Poinar، 1986 ؛ Wright، 1990). وكذلك استعمل مفهوم الأنواع البيولوجية وهو مناسب تمامًا للنيماتودا *Steinernema* ، كما يمكن إجراء التكاثر الخلقي (crossing experiments) لتحديد حالة محددة أو داخلية للسلالات الجغرافية العديدة التي تم اكتشافها (Poinar and Veremtschuk، 1970؛ Poinar، 1986، 1990) . نظرًا لاكتشاف المزيد من العزلات (يوجد الآن حوالي 36 نوعًا من الجنس*Steinernema* (Stock and Hunt, 2005)، تم استخدام القياسات فيما بينها كما تم استخدام التحليل الجيني لتحديد تشخيصها (Liu et al.، 2000 ؛ Ciche، 2007). في عام 1979 تم وصف جنس *Heterorhabditis* وكذلك وصف البكتيريا التكافلية لـ *Xenorhabditis luminescence*. على أنها *H. bacteriophora*. في عام 1979 (Poinar، 1976؛ Thomas and Poinar، 1979) حدد الصفة الرائعة للبكتيريا التكافلية لـ *Heterorhabditis* spp وكانت قدرتها على التألق لدرجة أن جثة الحشرة المصابة تتوهج في الظلام ويمكن اكتشاف الضوء حتى في مرحلة معدية واحدة 1IJ (Poinar et al.، 1980a). لاحقا تم نقل هذه الأنواع البكتيرية إلى جنس*Photorhabdus* (Boemare *et al*. 1993) تم توضيح موقع الخلايا البكتيرية في المرحلة المعدية IJ بالمجهر الإلكتروني (Poinar et al.، 1977) وتوضيح جوانب سلوكها بواسطة (Milstead, 1977). كما هو الحال مع *Steinernema* هناك العديد من الأنواع الجغرافية والسلالات (Heterorhabditis Poinar,1990 ؛ Stock and Hunt، 2005) ويشير التوزيع العالمي لكل من *Heterorhabditis* و *Steinernema* إلى أن سلالاتهم كانت موجودة عندما تم الجمع بين جميع كتل اليابسة ومن المثير للاهتمام أن نلاحظ أن التحليل الجيني أظهر أن *Heterorhabditis* هي مجموعة شقيقة للفقاريات الطفيلية القوية وأن كلا المجموعتين نشأت بشكل مستقل عن مجموعة *Rhabditis* التي تعيش بحرية (Kiontke et al.، 2007).

إن الارتباط التعايشي الاجباري المغاير مع جنس فريد من البكتيريا التكافلية المضيئة وقدرتها على دخول جسم الحشرات السليمة والتناوب بين الأجيال الجنسية والخنثوية والتشكل يفسر سبب وضع هذا الجنس في حالة العائلة. إحدى السمات الفريدة للاطوار المُعدية IJs لحالة توهج الجلد المتغاير التي تفتقر إليها

Steinernema **وأنواع *Rhabditis* الأخرى هي وجود "خطاف" ظهري على طرف الرأس الذي يساعد بدخول تجويف الجسم من خلال الغلاف الخارجي للعائل المضيف، وكذلك من خلال القصبة الهوائية وجدار الأمعاء (Bedding and Molyneux، 1982 ؛ Poinar and Georgis، 1990). مؤخرا تم عرض *Heterorhabditis* عندما تم اكتشاف أحفورة عمرها 100 مليون عام (*Proheterorhabditis burmanicus*) في كهرمان بورما في أوائل العصر الطباشيري (Poinar، 2011). أن إحدى الصفات التي ميزت *Heterorhabditis* عن الانواع الأخرى من Rhabditids هي قدرتها على نقل بكتيريا الإنارة المتالقة luminescent bacterium حيث تتوهج مومياء عثة الشمع Wax moth, *Galleria mellonella* في الظلام بعد إصابتها ب *Heterorhabditis* عند 48 ساعة من الاصابة. عام 1959 لاحظ <u>Dutky (1959)</u> لأول مرة خصائص المضادات الحيوية للبكتيريا المرتبطة بـ *S. carpocapsae* والتي أوضحت كيف يمكنها تدمير البكتيريا الغريبة التي غزت مومياء الحشرات التي تحتوي على النيماتودا النامية ومنذ ذلك الحين تم استبعاد العديد من المضادات الحيوية، بما في ذلك xenorhabdins ، xenocaumacins ، hydroxystilbenes ، ومشتقات indole ، ومشتقات anthraquinone ، من مستعمرات *Xenorhabdus* و*Photorhabdus* (Webster et al. 2002).**

في عام 1980 اكتشف (Akhurst, 1980) وجود أثنين او اكثر من المتغايرات الوراثية في مستعمرة *Xenorhabdus* في الطور المتطابق وراثيًا والتي تختلف في الشكل المورفولوجي للمستعمرة ولونها والنشاط المضاد للميكروبات في الاطوار الاولية التي تحمل طبيعيا عن طريق الاطوار المعدية يكون فيها الحد الأقصى لنمو النيماتودا وإنتاج المضادات الحيوية لكن الاطوار الأولية ستعود فجأة إلى الاطوار الثانوية والتي تكون أقل نشاطا لنمو النيماتودا وان إنتاج الأجسام المضادة يكون محدودا ويعتبر هذا التحول عقبة كبيرة في الإنتاج التجاري للنيماتودا وأن سبب هذا التحول المفاجئ في الطور غير معروف حتى تم اكتشاف بكتريا bacteriophage من متغاير *Xenorhabdus* التي لاتهاجم إلا الاطوار الأولية ويحصل التحول إلى المرحلة الثانوية استجابة للبقاء في المراحل الاولية لـ *Xenorhabdus*..

الحشرات لديها الكثير من ردود الفعل الدفاعية للطفيليات الغازية وأهمها ضد النيماتودا الممرضة للحشرات هي التصبغ والتغليف. عادة، تقتل البكتيريا العائل قبل أن يتاثر مستوى الاستجابة المميته ومع ذلك، في بعض العوائل التجريبية مثل البعوض فإن تفاعل الميلانين السريع سيقتل العدوى قبل أن يتمكنوا من إطلاق البكتيريا التكافلية (Bronskill، 1962 ؛ Welch and Bronskill، 1962) أيضًا، إذا كانت عدوى ب *S. carpocapsae* تفتقر إلى خلايا البكتيريا التكافلية الخاصة بها ، فيمكن تغليف مراحل التطور وقتلها حتى في يرقات دودة الشمع *Galleria mellonella* وهي المضيف الأكثر شيوعًا المستخدم لتربية النيماتودا الممرضة للحشرات (Poinar، 1969). هناك الكثير من الاعداء الطبيعية لمرحلة الاطوار المعدية للنيماتودا الممرضة للحشرات التي يجب مراعاتها، خاصةً البروتوزوا والفطريات. فعندما تغزوا النيماتودا *S. carpocapsae* اليرقات المصابة ب Microsporidians تم نقل عدوى البروتوزوا إلى النيماتودا (Veremchuk and Issi، 1970)، يمكن أيضًا إصابة مجموعات من النيماتودا الممرضة للحشرات التي

تحدث بشكل طبيعي بالعدوى Microsporidians (Poinar، 1988). كما أن المراحل المعدية من النيماتودا الممرضة للحشرات معرضة أيضًا للإصابة بالعديد من فطريات التربة الشائعة (Poinar and Jansson، 1986a، 1986b) مما يدل على أنه قبل تطبيق الديدان الخيطية على التربة الغنية بالدبال فمن الحكمة إجراء مسح للفطريات Nematophagous التي قد تكون موجودة في هذه الترب. عندما تم وصف أول نيماتودا ممرضة للحشرات *S. kraussei* ، في عام 1923 تم أختبار إمكانية استعمال هذه الديدان الخيطية في مجال المكافحة الاحيائية لأول مرة بواسطة Glaser وزملاؤه الذين بحثوا في النيماتودا *S. glaseri* للسيطرة في تجمعات الخنفساء اليابانية The Japanese beetle التي غزت ولاية نيوجيرسي و تم اختبار نمو هذه النيماتودا على أنواع مختلفة من الاوساط الغذائية الاصطناعية للإنتاج الكمي، بينما يرتبط النوع *S. glaseri* ببكتيريا تكافلية، لم يكن Glaser ومجموعته على دراية بوجودها وفقدت هذه البكتيريا أثناء عمليات التعقيم عندما تم نقل الديدان الخيطية إلى وسط غذائي اصطناعي فكان من حسن حظ فريق نيوجيرسي أن النيماتودا *S. glaseri* هي واحدة من أكثر الديدان الخيطية في هذا الجنس فيما يتعلق بقدرتها على التطور على البكتيريا الأخرى وكذلك الخميرة في غياب البكتريا المتعايشة معها، في حين أن الإنتاج أقل بكثير من البكتيريا التكافلية التي تحدث بشكل طبيعي و بإمكان الديدان الخيطية القتل والغزو والتدمير والتكاثر داخل الحشرات (Poinar، 1969). تم تحقيق الإنتاج الكمي على الاوساط الغذائية الاصطناعية وتم إجراء عمليات إطلاق كميات واسعة حقليا من النيماتودا *S. glaseri* باستخدامها من خزان مدفوع بمحرك كمعدات الرش الحقلية للمبيدات. في عام 1970 تم استخدام الحشرات الحية لإنتاج أول نيماتودا ممرضة للحشرات للاختبار الحقلي وقد استخدمت شركة Nutrilite Corporation في ليكفيو بكاليفورنيا يرقات عثة الشمع، *Galleria mellonella* لإنتاج Biotrol NCS-DD-136 في عام 1970 للاستخدام التجريبي. في عام 1981 أنتجت "مزرعة النيماتودا" في بيركلي العديد من النيماتودا الممرضة للحشرات (*S. carpocapsae* و *S. glaseri* و *H. bacteriophora*) على دودة الشمع *Galleria mellonella* للاستخدام التجاري ضد آفات الحدائق.

وفي عام 1981 أيضًا، قامت شركة BR Supply في إكستر بولاية كاليفورنيا بتربية النيماتودا *S. carpocapsae* على صراصير الليل وعبأت منتجًا يسمى Neocide لاستخدامه ضد دودة النجار Carpenter worm. في عام 1982، كانت Biosys في بالو ألتو بكاليفورنيا (التي تم إنشاؤها سابقًا باسم "مختبرات نيماتودا كاليفورنيا" في إميريفيل بكاليفورنيا أول من استخدم عملية التخمير من أجل الانتاج الواسع Mass production من النيماتودا *Steinernema* spp ومنتجاتها التجارية BioSafe و BioVector والتي استخدمت لمكافحة حشرات الحدائق. في عام 1983، أنتجت Biotechnology Australia نيماتودا على جزيئات من الإسفنج مشبعة بنظام غذائي اصطناعي بناءً على طريقة تم تطويرها سابقًا بواسطة (Bedding, 1981) واستخدم في هذه التقنية إسفنج البولي إيثر البولي يوريثين كدعم ثلاثي الأبعاد يسمح للديدان الخيطية بالتحرك عبرها وتوفير تبادل الهواء وكان منتجهم Otinem يستهدف سوس العنب الأسود Black vine weevils في أستراليا وأوروبا وتم لاحقًا تحسين الإنتاج التجاري للديدان الخيطية الممرضة للحشرات في المزرعة السائلة من قبل فريق من الباحثين بقيادة فريدمان (1990) في

شركة Biosys Inc. وظهر عدد من الشركات الصغيرة الإضافية بعضها كصناعات منزلية وذلك في منتصف الثمانينيات. لقد واجهت عملية تسويق الديدان الخيطية الممرضة للحشرات إحدى المشاكل الخطيرة وبصرف النظر عن الإنتاج الضخم، هي عملية التخزين في ظل ظروف تحافظ على قاليتها العالية للبقاء جنبًا إلى جنب مع ارتفاع معدل العدوى. كان التبريد طريقة مناسبة ولكنها ليست عملية لصغار المسوقين والمزارعين الذين يريدون بيع أو تطبيق النيماتودا على مدى عدة أسابيع أو حتى أيام. ثم بدأت الدراسات حول إمكانية تجفيف الديدان الخيطية بحيث يمكن تخزينها في درجات حرارة الغرفة. في عام 1973اكتشف Simons and (Poinar ,1973) أنه إذا تم تجفيف الاطوار المعدية IJs من النيماتودا *S. carpocapsae* ببطء فإنها تدخل في الطور اللامائي الجزئي a partial anhydrobiosis ويمكن لاحقا اعادة حيويتها بسرعة عند اضافة الماء ولا تزال تحتفظ بالعدوى. بناءً على هذه النتائج ، طور (Bedding،1988) في وقت لاحق تركيبة "شطيرة طينية" Clay sandwich حيث يتم وضع الديدان الخيطية في طبقات من الطين لإزالة المياه السطحية لتحفيز حالة اللامائية الجزئي partial anhydrobiosis Anhydrobiosis كذلك تم استخدامها لتعزيز استقرار التخزين للديدان الخيطية الممرضة للحشرات. في عام 2000 (Grewal، 2000) طور العلماء توليفة سميت alginate formulation التي استخدم فيها صفائح Calcium alginate الموزعة على شاشات بلاستيكية لإيقاع الديدان الخيطية والحفاظ عليها. في 1994اطلق (Bedding and Butler 1994,) تركيبة يتم فيها خلط الديدان الخيطية المحملة على الطين مع مسحوق من بولي أكريلاميد لا مائي anhydrous polyacrylamide لاحداث نشاط مائي في توليفة حبيبية يتم فيها تغليف الديدان الخيطية جزئيًا في دقيق البرسيم ودقيق القمح. لاحقًا في 1994 وصف Connick et al. (1993) توليفة حبيبة من النيماتودا تم فيها توزيع الديدان الخيطية عبر مصفوفة جلوتين القمح تضمنت هذه التوليفة مرشحًا ومرطبًا لتعزيز بقاء الديدان الخيطية فعالة ونشطة. في عام 1995 تم الاعلان عن قفزة كبيرة في تطوير توليفات النيماتودا الممرضة للحشرات EPN من قبل (Silver et al. 1995) الذي طور توليفة حبيبية قابلة للتشتت بالماء حيث تم تغليف الديدان الخيطية في حبيبات قطرها 10-20 مم تتكون من خليط من أنواع مختلفة من السيليكا والطين والسليلوز واللجنين والنشا. مع هذه التوليفة تم تمديد العمر التخزيني للنيماتودا *S. carpocapsae* المنتج تجاريًا إلى 7 أشهر في درجات الحرارة المحيطة (Gaugler et al.، 2000). كما شكلت التطبيقات ضد الآفات الهوائية (فوق سطح الارض) مشكلة لأنه إذا جفت الديدان الخيطية بسرعة كبيرة فإن فعاليتها تقل بشكل كبير لذلك استخدم Webster and Bronskill (1968) مثبطًا للتبخر لإطالة عمر النيماتودا المستخدمة ضد الآفات الورقية. مع التطور باستعمال النيماتودا الممرضة للحشرات حصلت امكانية لتطبيق الاطوار المعدية من الديدان الخيطية بسهولة باستخدام معدات مبيدات الآفات التقليدية، ومع ذلك، فإن تطبيق الديدان الخيطية في وقت واحد مع العوامل الأخرى يوفر تكاليف العمالة. اشار Rao et al. (1975) أن النيماتودا *S. carpocapsae* يمكن خلطها مع بعض المبيدات الحشرية في تجاربهم ضد دودة جذور الذرة Corn rootworm (Poinar et al. 1983) كما اجري تطبيق الاطوار المعدية من النيماتودا *S. carpocapsae* مع الأسمدة السائلة. أعقب هذه النتائج الأولية سلسلة من الدراسات الشاملة حول آثار الجمع

بين الاطوار المعدية من النيماتودا *Steinernema* و *Heterorhabditis* مع مبيدات الآفات (Rovesti and Deseo، 1989، 1990، 1991). نظرًا لأن معلومات التوافق ضرورية لتنفيذ النيماتودا في أنظمة إدارة الآفات المتكاملة فقد تم نشر مراجعة شاملة حول ذلك من قبل Koppenhöfer and Grewal (,2005). قام Kaya and Nelson (1985) بالتحقيق في تطبيق الاطوار المعدية في المواد الهلامية alginate gels لزيادة ثبات النيماتودا و تسويقها بشكل تجاري عند التطبيق ضد الافات التي تصيب سيقان الاشجار. لقد جربت العديد من الانظمة لحل المشكلات التي تواجه التطبيق الحقلي من حيث تقييم تأثير حجم القطرات، فروق الضغط، الفوهات الهيدروليكية، مجالات تدفق الانكماش والتحريض، على قابلية النيماتودا للحياة وضراوتها. Reed et al. (1986) كان أول من استخدم الديدان الخيطية من خلال الري بالتنقيط ومن خلال الري المحوري ومن خلال أنظمة الري بالأخدود. بعد ذلك تم الاعلان عن التطبيق تحت السطحي للديدان الخيطية ثم استخدمت طريقة لنقع قصاصات النبات في معلقات الديدان الخيطية للتحكم في عثة artichoke plume moth بينما اقترح (Pye and Pye, 1985) طريقة غمس الجذر لتقدير معدلات تطبيق النيماتودا بعد ذلك تم استخدام تركيبة بمادة هلامية ماصة للنيماتودا وبطيئة الاطلاق لها في مكافحة افات اشجار الحمضيات (Georgis, 1990) وتم استخدام تركيبة مماثلة (كيس شاي Tea bag) في مكافحة حشرات بذور اللفت الزيتية (Menzler-Hokkanen and Hokkanen، 2004). يمكن أن تعمل جثث الحشرات المصابة أيضًا كنظم إطلاق بطيئة للنيماتودا حيث قام كل من (Jansson and Lecrone، 1994) و Shapiro-Illan et al (2001) بتحسين هذه الطريقة من خلال التطبيق عن طريق استخدام جثث حشرات مصابة بالديدان الخيطية مع نشا قوي لتقليل التصاقها. في 1989 طور (Miller, 1989) تقنية لتقييم الإمراضية لتحديد ضراوة النيماتودا *S. carpocapsae* المنتج تجاريًا. سميت هذه الطريقة فيما بعد بـ *Galleria mellonella* bioassay (Converse and Miller, 1999). اما Grewal et al. (1999) طور طريقة آبار الرمل Sand-well method وهي مناسبة للتقييم الروتيني لجودة معظم أنواع الديدان الخيطية الممرضة للحشرات بتركيزات منخفضة كما توجد العديد من الطرائق الاخرى تستعمل كمؤشرات للعدوى أو الإمراضية أو الجودة العامة لتقييم النيماتودا المنتجة تجاريًا، وبالتالي رفع مستوى الوعي حول أهمية مراقبة الجودة الفعالة أثناء التسويق كما نوقشت العديد من عوامل نجاح وفشل الديدان الخيطية الممرضة للحشرات المستخدمة كعوامل للمكافحة الاحيائية. في 1965 اثير الانتباه إلى سلوك الاطوار المعدية IJs وكيف تتمكن من تحديد مكان العوائل الحشرية المضيفة وبخصوص ذلك وصف Reed and Wallace (1965) ثلاثة أنواع من حركة الاطوار المعدية من النيماتودا *S. carpocapsae* وهي الانزلاق gliding والوصول او التجسير bridging والقفز leaping. استخدمت الاطوار المعدية IJs حركة مزلقة للوصول إلى سطح التربة وتضمنت حركة التجسير في الديدان الخيطية الوقوف على ذيولها وتلوح بنهاياتها الأمامية (متمايلة) وقد لوحظ مثل هذا السلوك بالفعل في النيماتودا *Rhabditids* التي تعيش بحرية والتي كانت لها علاقات مع الحشرات. يتألف سلوك القفزة المذهلة amazing leaping من قيام الاطوار المعدية بلف أجسامهم حول قطرة ماء (التي أنتجت قوة توتر) وإطلاق القطرة فجأة عن طريق فك اللفافة ودفعها أفقيًا عبر

الركيزة بواسطة قوة التوتر وكانت القفزة الفعلية سريعة جدًا بحيث لا يمكن متابعتها بالعين المجردة. من الواضح أن الاطوار المعدية تستخدم أدلة مختلفة لتحديد عوائلها المضيقة وقد بين Byers and Poinar (1982) ان الاطوار المعدية للنيماتودا *S. carpocapsae* تحدد عوائلها بواسطة تدرجات درجة الحرارة الدقيقة، بينما بين Lewis et al. (1992) أن عدوى النيماتودا *S. carpocapsae* و *S. glaseri* تكون استجابتهما للمنبهات المتقلبة المتطايرة طويلة المدى . في 1981 تم تحديد الاختلافات في التوزيع والانتشار العمودي والأفقي لعدوى النيماتودا*Steinernema* على أنها مرتبطة بسلوك العثور على العائل المضيف فلوحظ أن النيماتودا *S. carpocapsae* لم تغير موقعها بشكل كبير من موقع التطبيق بينما تتحرك النيماتودا *S. glaseri* لمسافات طويلة أفقيًا. بين Georgis and Poinar (1983a, 1983b) كيف أثرت نسجة التربة على توزيع وإصابة النيماتودا *S. carpocapsae* و *S. glaseri* والبقاء والحركة الأفقية للاطوارالمعدية للنيماتودا *S. carpocapsae*، وكذلك على الحركة العمودية الهجرة للنيماتودا *Heterorhabditis* spp في التربة. وصفت سلسلة من الدراسات التي أجريت في مختبر Gaugler سلوكين اثنين لإيجاد العائل المضيف في الاطوار المعدية المعدية هما الكمائن والطرادات فتتكييف الديدان الخيطية التي تستخدم نوع الكمين في البحث عن العائل بشكل أفضل في تحديد مواقع العوائل المضيفة شديدة الحركة على سطح التربة بينما تكون أنواع الديدان الخيطية التي تستخدم نوع الطراد أكثر تكيفًا مع المضيفات المستقرة في التربة. اقترح (Gaugler and Campbell, 1991) أن نوع الكمين لسلوك اكتشاف المضيف قد يفسر الحركة المحدودة لبعض أنواع الديدان الخيطية الممرضة للحشرات في التربة. كما أظهر سلوك النيماتودا *S. feutre* و *S. riobrave* استخدام نوعًا وسطيا من سلوك البحث عن الطعام بين الكمين والإبحار الذي يظهره النوعين*S. carpocapsae* و *S. glaseri*. أظهرت هذه الدراسات للباحثين أنه من الممكن مطابقة سلوك الديدان الخيطية في العثور على المضيف مع مؤشرات تاريخ حياة الآفات المستهدفة. لخص Poinar (1979) التقارير المبكرة حول تحدي اللافقاريات والفقاريات غير الحشرية مع النيماتودا *S. carpocapsae* وفي وقت لاحق أظهر سلامة الديدان الخيطية الممرضة للحشرات على اللافقاريات في التربة بصرف النظر عن التقرير السلبي للقتل الذي تسببه النيماتودا *S. carpocapsae* لنحل العسل البالغ (Hackett and Poinar، 1973) ، وبينت التقارير ان هذه الديدان الخيطية لها تأثير ضئيل على اللافقاريات غير المستهدفة. ومع ذلك ، وبصرف النظر عن استخدامها للسيطرة على مجموعة واسعة من الحشرات فإن قابلية الديدان الخيطية الممرضة للحشرات على إصابة بعض المجموعات غير الحشرات كانت مقبولة نوعما. اكتشف Samish and Glazer (1991) أن الديدان الخيطية الممرضة للحشرات قادرة على قتل إناث قراد الماشية المحتقنة وتم العثور على القراد من أجناس *Amblyomma* و *Argas* و *Boophilus* و *Dermacenteor* و *Hylomma* و *Rhipicephalus* لتكون عرضة للاصابة بالديدان الخيطية الممرضة للحشرات (Glazer et al.، 2005). على الرغم من أن الديدان الخيطية المعدية يمكن أن تغزو وتقتل القراد وبالتالي لديها القدرة على السيطرة عليها لكن لايوجد دليل على تكاثر الديدان الخيطية في العناكب. أن بعض الحشرات الناقلة للأمراض البشرية معرضة أيضًا للإصابة بالديدان الخيطية الممرضة للحشرات وتم إثبات حساسية البراغيث

لأول مرة مع برغوث القط ، Ctenocephalides من قبل .(Silverman et al., 1982). قامت شركة Biosys بتطوير منتج للمكافحة الاحيائية باستخدام النيماتودا *S. carpocapsae* لمكافحة البراغيث في المروج المنزلية كجزء من برنامج مكافحة متكامل (Manweiler، 1994). تم توضيح قابلية قمل الجسم Pediculus humanus للإصابة بالديدان الخيطية الممرضة للحشرات لأول مرة بواسطة .Weiss et al 1993)) و أفادوا أن النيماتودا *S. carpocapsae* و *S. glaseri* تسببا في قتل أكثر من 85 ٪ من قمل الإناث خلال 24 ساعة. أما (Doucet et al. (1998 فقد أظهر أن قمل الرأس P. humanus capitis هو أيضًا عرضة للنيماتودا الممرضة للحشرات كما تبين أن يرقات ذباب Phlebotomine الناقلة لداء الليشمانيات معرضة أيضًا للإصابة بالنيماتودا *Steinernema* و *Heterorhabditis* (.Poinar et al، 1993). هناك بعض التقارير تشير الى إصابات بعض الفقاريات بالديدان الخيطية الممرضة للحشرات، حيث سببت عدوى بالنيماتودا *S. carpocapsae* قتل الضفادع الصغيرة من الضفادع الأنتيلية Bufo marinus (Kermarrec and Mauléon, 1985)، وتسببت العدوى بالنيماتودا *Heterorhabditis* و *Steinernema* في موت الضفادع الصغيرة frog tadpoles (Poinar and Thomas، 1988). في حين أن الجريان السطحي يمكن أن يحمل الاطوار المعدية IJs إلى المياه الراكدة حيث تتواجد الضفادع الصغيرة لذلك سيكون احتمالية ملامستها ليرقات البرمائيات ضئيلة.

على الرغم من أن المجموعات الطبيعية من الديدان الخيطية الممرضة للحشرات متكيفة بشكل جيد مع موطنها الأصلي ومضيفها من خلال الانتقاء الطبيعي لكن يمكن إنشاء صفات مفيدة إضافية في جينومها لجعلها أكثر كفاءة ضد العوائل المضيفة الآخرى في بيئات مختلفة. ناقش (Poinar , 1991) بعض الصفات المرغوبة التي يمكن إدخالها في الديدان الخيطية الممرضة للحشرات من خلال تقنية الحمض النووي المؤتلف مثل الحقن المجهري وزرع الجينات والطفرات والتربية الانتقائية. في عام 1980 ، طور Burman و Pye سلالة انتقائية لدرجات الحرارة من النيماتودا *S. carcopasae* التي تنجذب نحو درجة الحرارة التي خضعت عندها للتطور. تمكن (Fodor et al. 1989) من الحصول على طفرات من النيماتودا *S. carpocapsae* التي كانت مقاومة لمضادات الديدان. اما (Gaugler et al. 1989) استخدم التربية الانتقائية لتحسين العثور على العائل في النيماتودا *S. carpocapsae* كما استخدم الحقن المجهري لإنتاج سلالة معدلة وراثيًا من النيماتودا *H. bacteriophora* التي تضم جين بروتين صدمة الحرارة من النيماتودا *Caenorhabditis elegans*. كما أن التلاعب الجيني للبكتيريا التكافلية ممكن احداثه أيضًا وقد أجريت دراسات لفحص جينوم البكتريا المتعايشة *Photorhabdus luminescens*.

تصنيف النيماتودا الممرضة للحشرات
Entomopathogenic Nemadotes Identification

يوجد العديد من انواع النيماتودا الممرضة للحشرات ضمن عائلتي ***Steinernematidae (Steinernema)*** و ***Heterorhabditidae (Heterorhabditis)*** تنتج تجاريا وتستخدم كعوامل مكافحة أحيائية ضد العديد من الافات الحشرية في التربة او في اماكن اخرى مخفية من الانسجة النباتية في العديد من دول العالم حيث تتمكن من قتل العائل في غضون 48 ساعة بفعل البكتريا المتعايشة معها.

يستلزم تصنيف النيماتودا الممرضة للحشرات **EPNs** توفر تقنيات خاصة تجرى في خطوات تبدء من عزل النيماتودا من التربة أو الانسجة النباتية أو أجسام الحشرات المصابة كما يجب توفر مجاهر عالية القدرة للتكبير لغرض مشاهدة الاجزاء الدقيقة من جسم النيماتودا وكذلك تدريب خاص في بروتوكولات واليات التصنيف. تستعمل تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل **Polymerase Chain Reaction (PCR)** من نوع **Quantitative real-time PCR (qPCR)** في تصنيف النيماتودا الممرضة للحشرات وذلك للحصول على التمييز التصنيفي لقراءات متتابعة **Sequencing** من أجزاء مختلفة من جين الرنا الرسول **rRNA gene** وعدد النقاط الاساس لتسلسل عالي الجودة ومطابقتها مع قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية **(NCBI) National Center for Biotechnology Information**. كما يمكن أستخدام المجهر الالكتروني الماسح **Electron Scanning Electron microscopy** في هذا التصنيف. في **2018** تم في العراق تشخيص نوعين من النيماتودا الممرضة للحشرات عزلت من الاعضاء التناسلية **(Collateral Glands)** في **Genittal region** لاناث حفارات النخيل التي تتبع الجنس ***Oryctes*** وهما ***Metarhabditis blumi*** و ***Metarhabditis adenobia*** وذلك بالتعاون مع **Walter Sudhaous/** المعهد البايولوجي الالماني.

هناك العديد من البروتوكولات لتصنيف النيماتودا الممرضة للحشرات ومنها تجرى وفق الخطوات الاتية :

- عزل ال **DNA** من الطور المعدي للنيماتودا.
- سحق **2000** طور معدي من النيماتودا في **15** مايكرولتر محلول متعادل **buffer** في تفاعل البلمرة المتسلسل **PCR**.
- تنقل الى انبوب معقم ومبرد يحتوي على **10** ميكرولتر من نفس المحلول المتعادل.
- يحضن الانبوب تحت درجة – **70** ^{0}س لمدة **15** دقيقة ثم **60** ^{0}س.
- يضاف للمحلول **5** مايكرولتر من **60** ميكروغرام بروتينيز **K proteinase ml**$^{-1}$.
- يحضن لمدة **2** ساعة تحت درجة حرارة **65** ^{0}س.
- التسخين لمدة **15** دقيقة تحت درجة حرارة **95** ^{0}س.
- الطرد المركزي لمدة **15** دقيقة ب **15000** دورة/ دقيقة.
- يجمع ال **DNA** ويخزن تحت درجة – **70** ^{0}س لحين الاستعمال.
- يستخدم **1%** من اكاروس هلام الجل **agarose gel** في الترحيل او الفصل الكهربائي **Electrophoresis** و الطيف الكهرومغناطيسي **Spectrophotometer** لتتحديد كمية ونوعية ال **DNA.**

-

Kingdom: Animalia, animals

Eumetazoa, metazoans

Bilateria, bilaterally symmetrical animals

Protostomia, protostomes

Ecdysozoa

Phylum: Nematoda, roundworms

Class: Secernentea

Order: Rhabditida

Family: *Steinernematidae*

Family: *Heterorhabditidae*

Genus (*Steinernematidae*): *Steinernema* and *Neosteinernema*

Genus (*Heterorhabditidae*): *Heterorhabditis* and *Metarhabditis*

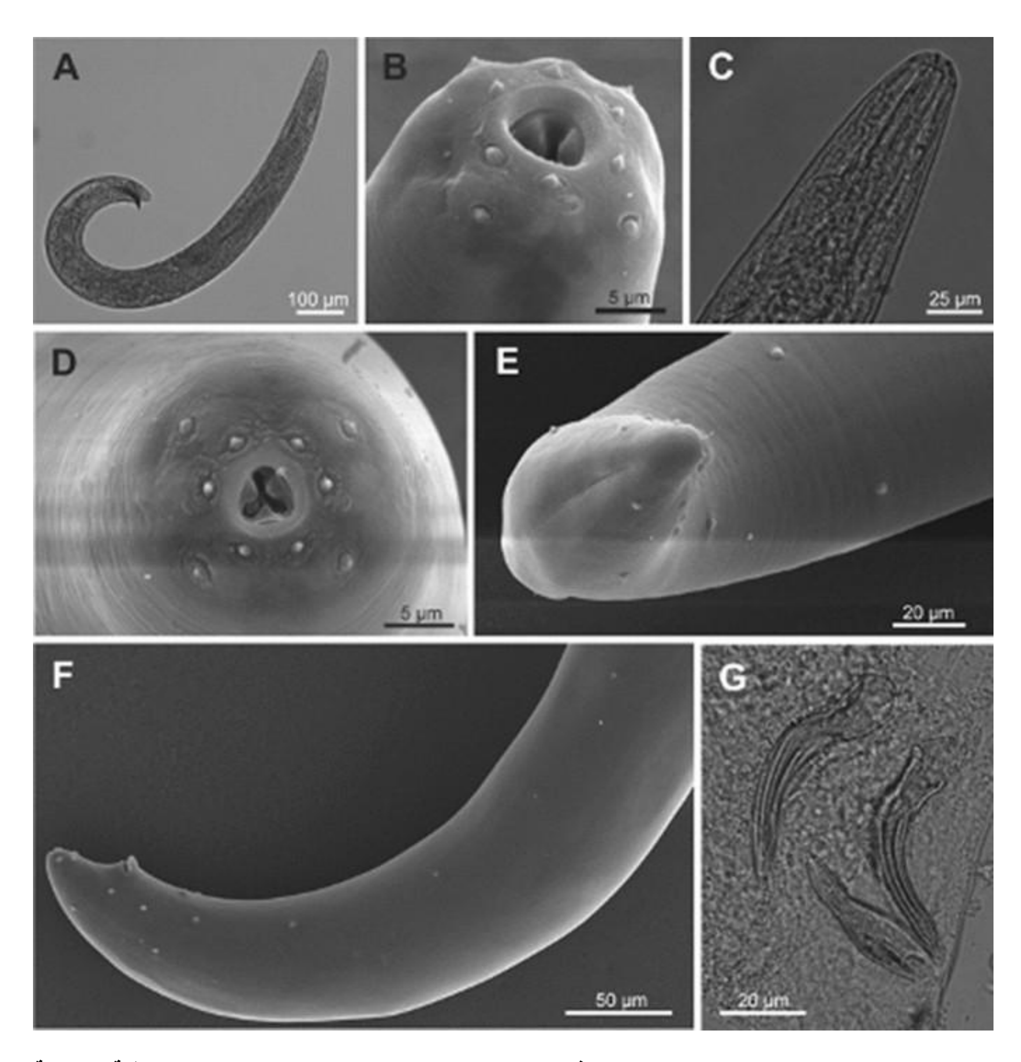
الفصل الثاني

الشكل الخارجي للنيماتودا الممرضة للحشرات

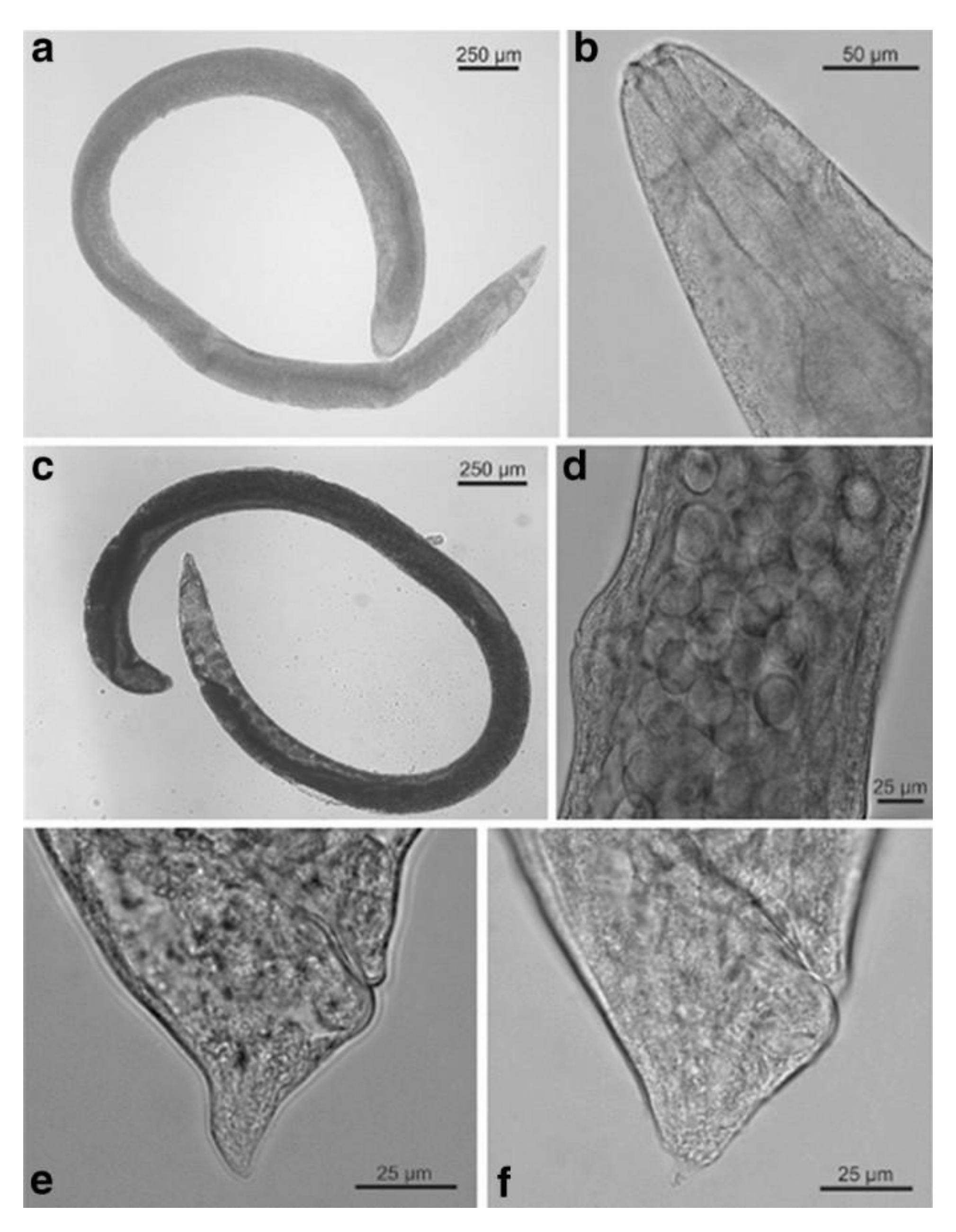
Morphological, molecular and ecological characterization of Entomopathogenic Nematodes

النيماتودا (الديدان الخيطية) **Nematodes** هي ديدان مستديرة غير مجزأة، متطاولة عديمة اللون، بدون زوائد، وعادة ماتكون مجهرية (شكل 6) ذكور الجيل الأول ذات جسم على شكل حرف C أو J للخلف عندما تستعمل الحرارة في قتلها (الشكل 1 A)، الكيوتكل ناعم على نحو سلس تحت المجهر الضوئي، الجوانب غير واضحة شفوية، الطرف الامامي مستدير قليلا فيه ست شفاه بارزة وكل شفة تحمل حليمة شفوية وهناك اربع حليمات راسية عليا كما توجد فتحة صغيرة خلف الحليمات الجانبية للشفة، المرئ ذو عضلة اسطوانية والجسم متصلب جوانبي الجسم غير واضحة فيها شويكات متقرنه ومتناضرة الشكل منحنية لونها بني (الشكل 1G)، الراس مستطيل ذو رمح يشبه القارب عند النظر اليه من الجانب الامامي ونهاية الجسم منحنية نحو البطن، الذيل مخروطي (الشكل 1 E) ويحتوي 11 زوج من الحليمات. اما ذكر الجيل الثاني فيشبه ذكور الجيل الاول ولكنه اكثر اسطوانية في الشكل واصغر منه في طول الجسم والصفات المورفولوجية الاخرى، الذيل اطول منه في ذكر الجيل الاول. أناث الجيل الاول ذات جسم قوي (كيوتكل) وعلى شكل حرف C (شكل 2 A) ، الشفتين ومنطقة المرئ مشابهة لما موجود في الذكور، فتحة الخروج موجودة في منطقة **Metacorpus** (شكل B2) الجهاز التناسلي من نوع **didelphic-amphidelphic** والمبايض موجوده على الجزء الظهري من الجسم الفرج ذو شق عرضي يقع في منتصف الجسم ويحتوي نتوء مزدوج (شكل D2) المهبل قصير يؤدي الى رحم مزدوج، الذيل مخروطي فيه تورم خلف الشرج البطني (شكل E2). اما أناث الجيل الثاني فهي تشبه اناث الجيل الاول (شكل C2) لكنها أصغر حجما يقع الفرج في الخلف قليلا مقارنة باناث الجيل الاول لها شفتين متماثلتين والذيل اطول قليلا مقارنة باناث الجيل الاول وهو مخروطي الشكل ذو تورم طفيف عند الشرج (شكل F2). مرحلة الجيل الثالث **Third juvenile stage** ذو جسم نحيف واسطواني الشكل الكيوتكل ناعم ومستدق الراس مستمر مع محيط الجسم قليلا (شكل A3) الحليمات الشفوية تلاحظ مفتوحة من الجانبين، الفتحات تحتوي على اربع حليمات شفوية متميزة (شكل D3) فتحة الفم وفتحة المخرج مغلقة، المرئ طويل وضيق ويتوسع قليلا عند النهاية (شكل A3) فتحة المخرج قرب مستوى منتصف منطقة المرئ ولم يلاحظ تغذية هذه المرحلة ويحتوي جسم هذا الطور كيس للبكتريا صغير الحجم عند الجزء الامامي من الامعاء أما الذيل فشكله مخروطي يتناقص تدريجيا (شكل D , E3)، **hyaline portion** يعادل 36% من طول الذيل (شكل D 3)، كما يوضح (الشكل 4)بعض صفات الطور الثالث للنيماتودا الممرضة للحشرات.

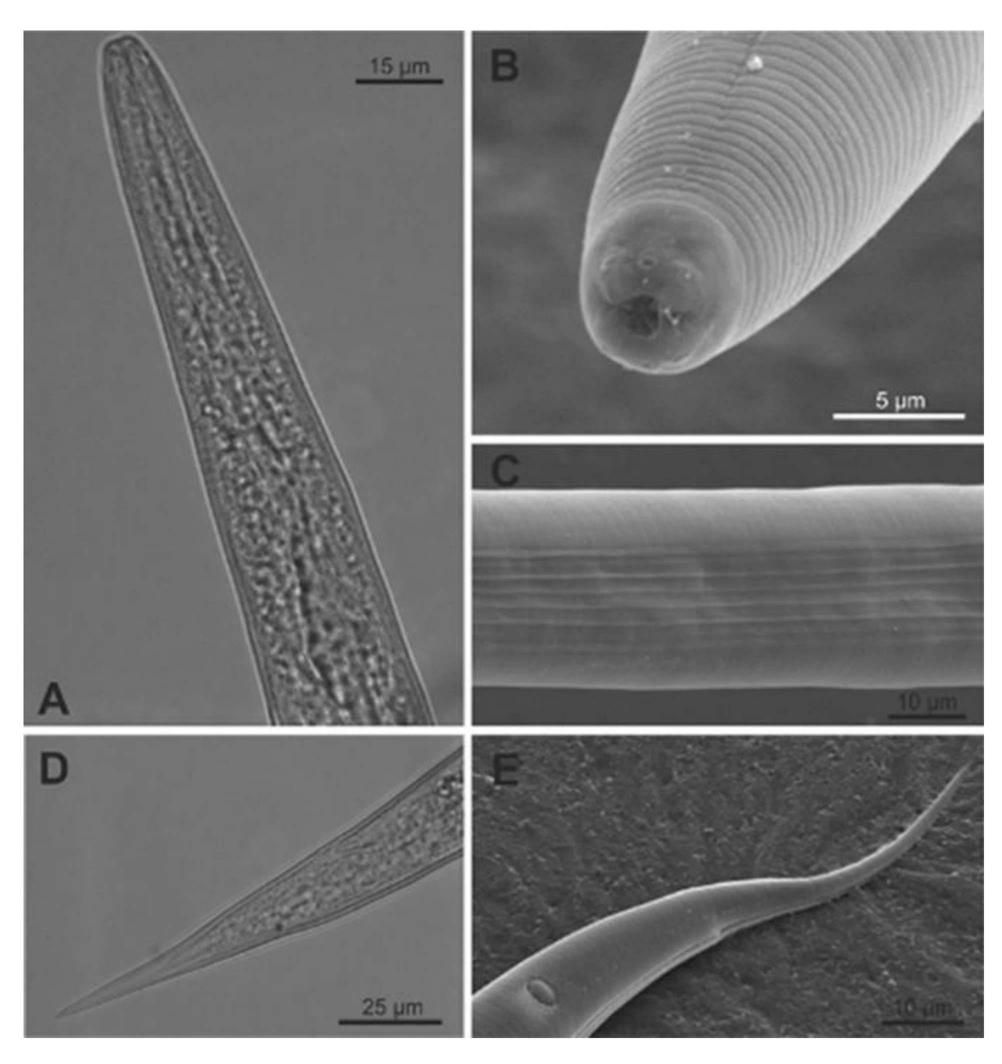
هذه الصفات المورفولوجية للنيماتودا الممرضة للحشرات EPN ***Steinernema feltiae*** وهناك اختلافات بين الانواع والاجناس في ابعاد الجسم وشكله كما موضح في (الشكل 5) و(الشكل 6 – أ و ب) والجدول رقم 1.



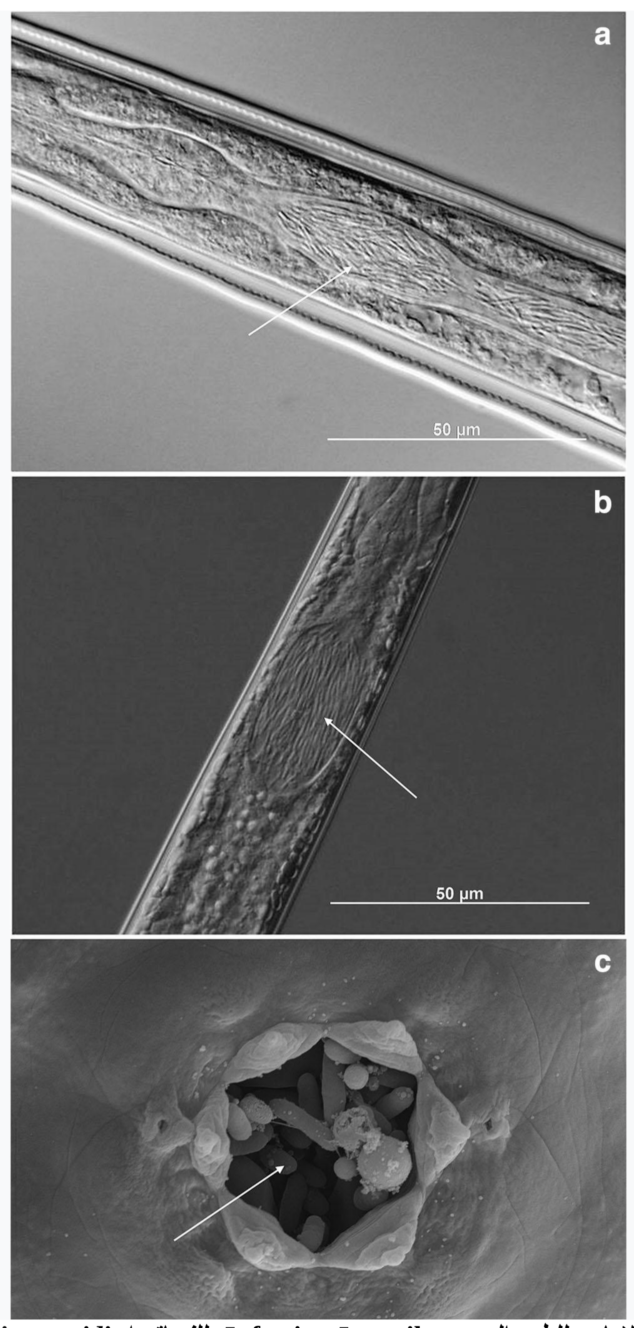
شكل 1. النيماتودا *Steinernema feltiae* ذكر الجيل الاول. A الجسم كامل، B و D المنطقة الامامية (الراسية) يظهر فيها الشفاه والحليمات الشفوية labial papillae والرأسية cephalic papillae، C المنطقة الامامية ويظهر فيها مكان الثقوب التنفسية، A الذيل، F المنطقة الخلفية ويظهر فيها الحليمات التناسلية والشويكات، G الشويكات وgubernaculums. عن Flores, *et al.* 2021



شكل 2. النيماتودا *Steinernema feltiae* أنثى اجيل الاول. a الجسم كامل ، b المنطقة الامامية تظهر المرئ وثقب الخروج. الجيل الثاني c الجسم كامل. الجيل الاول d منطقة الفرج Vulvar region ، e الذيل. الجيل الثاني f الذيل. عن Flores, *et al.* 2021

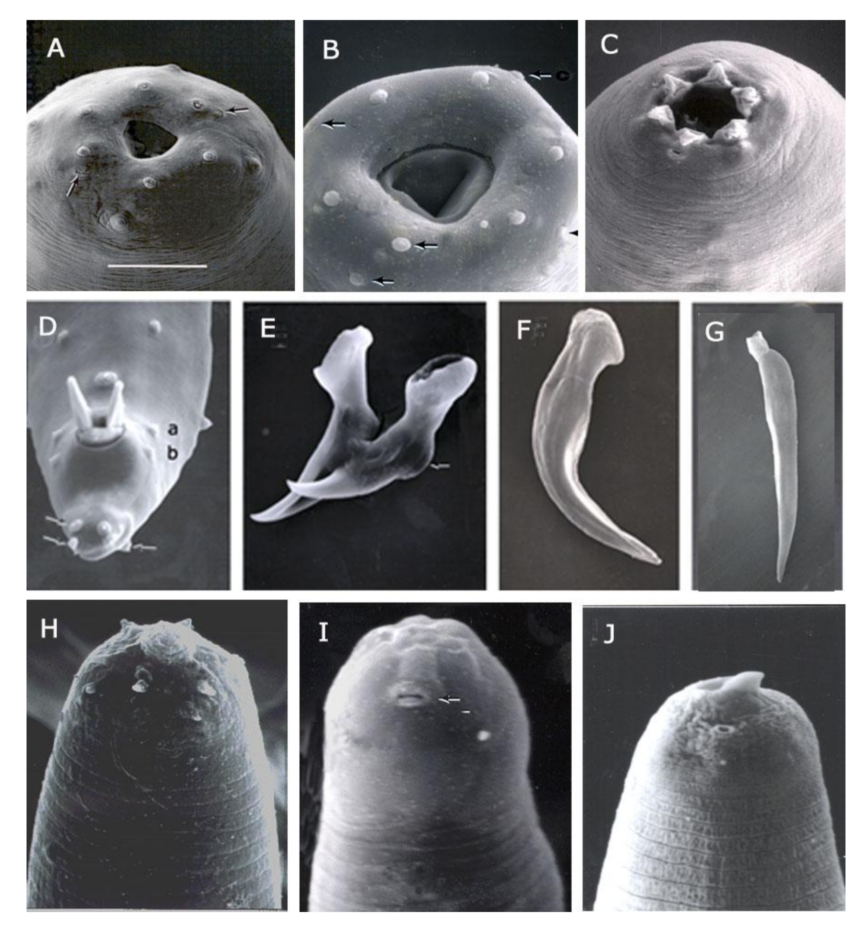


شكل 3. الطور الثالث المعدي Infective juvenile للنيماتودا *Steinernema feltiae*، A المنطقة الامامية ويلاحظ فيها المرئ، B المنطقة الامامية ويلاحظ فيها حليمة راسية، C المجال الجانبي منتصف الجسم، D hyaline portion، Eالذيل. عن Flores, *et al.* 2021



شكل 4. الطرف الامامي للطور المعدي **Infective Juvenile** للنيماتودا ***Heterorhabditis megidis*** ، السهم يؤشر داخل الامعاء الكيس البكتيري للبكتريا ***Photorhabdus temperata*** **(a)**. الطرف الامامي للطور المعدي **Infective Juvenile** للنيماتودا ***Steinernema intermedium***، السهم يؤشر داخل الامعاء الكيس البكتيري للبكتريا ***Xenorhabdus bovienii*** **(b)**. الاكياس البكتيرية للبكتريا ***Photorhabdus temperate*** داخل فم أنثى الجيل الاول للنيماتودا ***Heterorhabditis zealandica*** **(c)**. الصور **a** و **b** باستخدام مجهر تباين التداخل التفاضلي والصورة **c** باستخدام المجهر الالكتروني الماسح.

عن: **Sajnaga, E. and Kazimierczak, W. 2020**



شكل 5. الشكل الخارجي بعض اجزاء جسم النيماتودا الممرضة للحشرات
Steinernema, Neosteinernema and Heterorhabditis

A - C رأس الانثى: A *Steinernema glaseri* B ،*Neosteinernema* ، C *Heterorhabditis hermaphrodite*

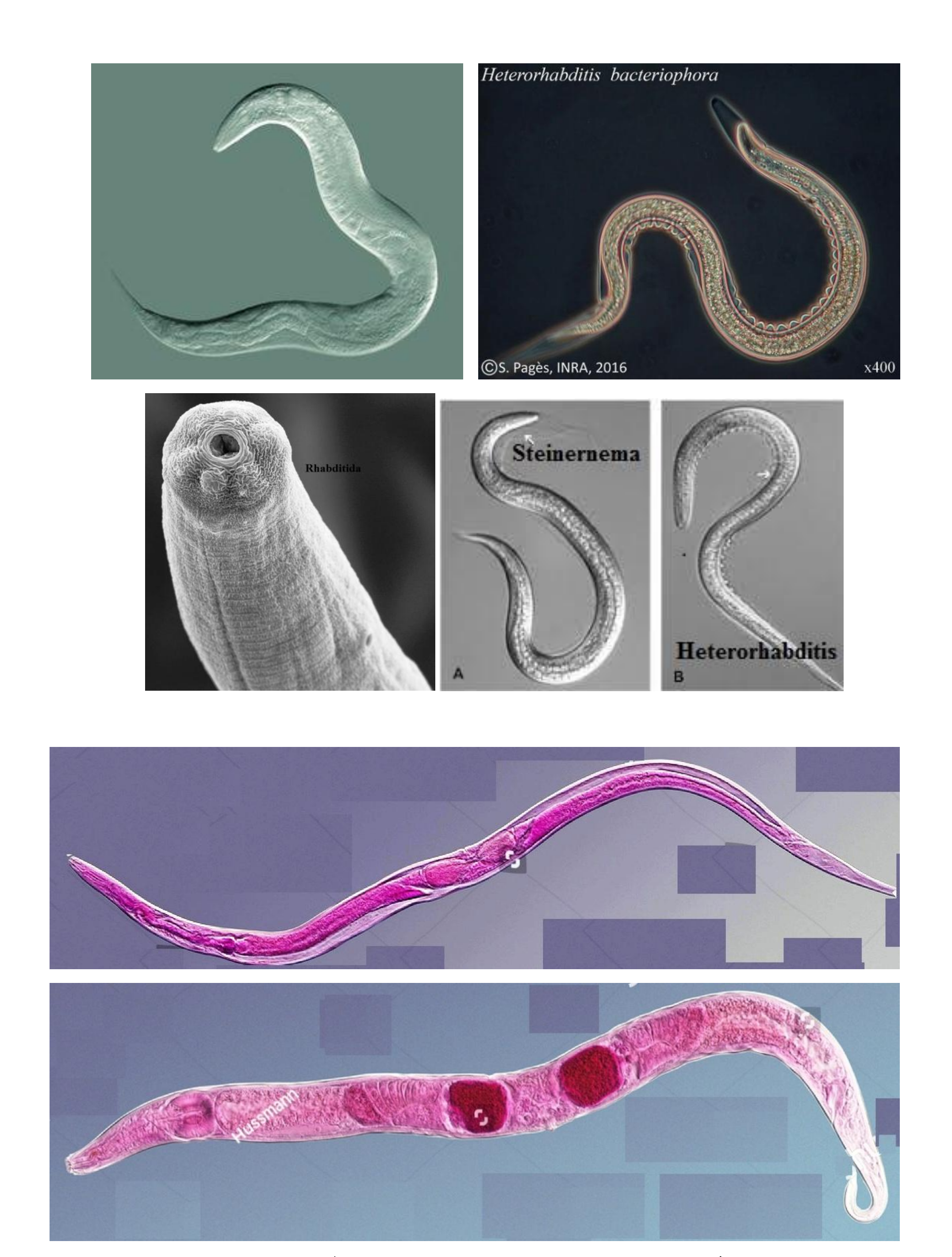
D- G تركيب الذكر: D المنطقة الخلفية للنيماتودا *Steinernema* مع الحليمات.

E Spicule وgubernaculum للنيماتودا *Neosteinernema*.

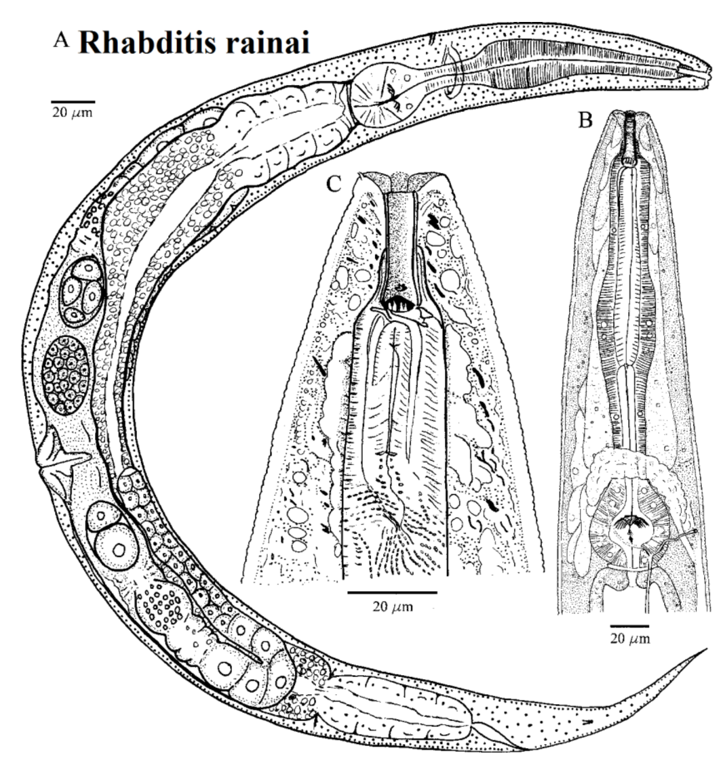
F Spicule للنيماتودا *Steinernema* .

H - J رأس الطور المعدي Infective Juvvenile للنيماتودا : H *Steinernema scapterisci* I *Neosteinernema longicurvicauda* ، J *Heterorhabditis bacteriophora*

عن/ Nguyen,K. B. 2002



شكل 6 – أ. الشكل الخارجي لبعض انواع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs



شكل 6- ب. الشكل الخارجي لبعض انواع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs.

جدول 1. أبعاد جسم بعض أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات (مايكرومتر):

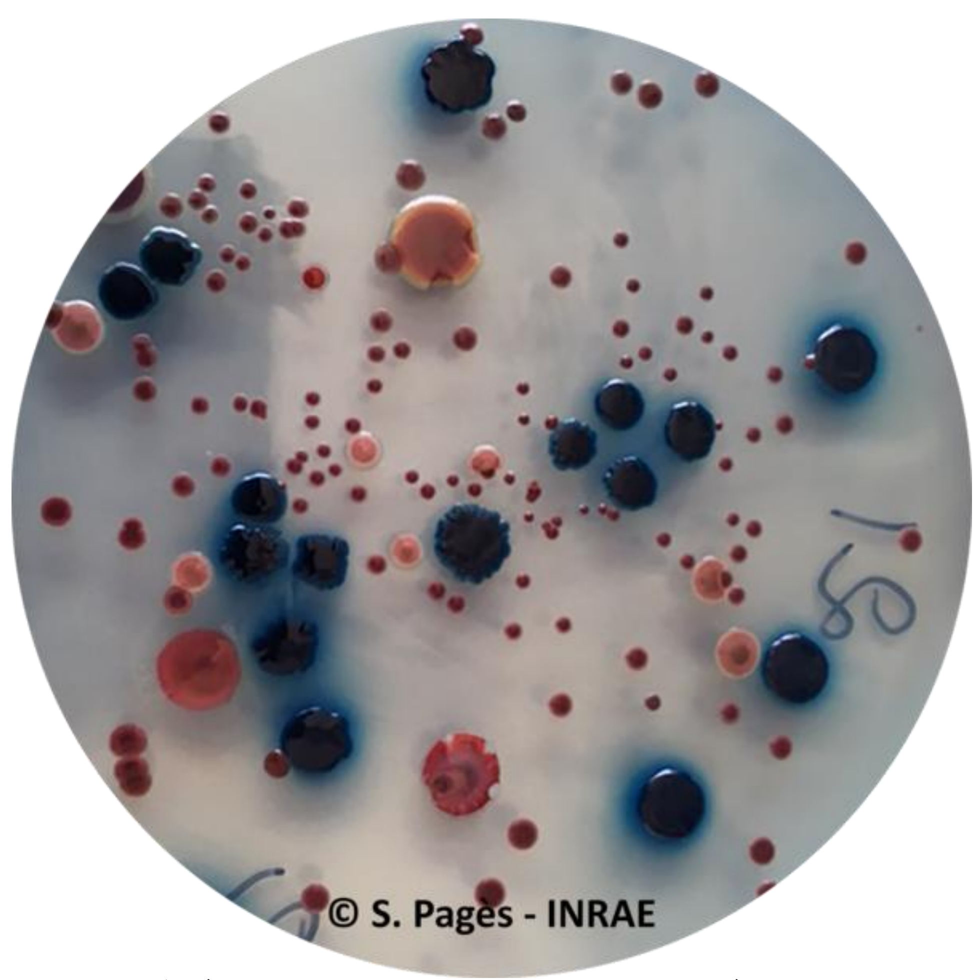
الطول	العرض	من النهاية الداخلية حتى فتحة المخرج	طول المرئ Esophagus	طول الذيل Tail
489 - 446	21 - 18	38 - 30	106 - 94	42 - 35
528 - 512	20 - 19	97 - 90	115 - 104	101 - 98
721 - 582	42 - 39	123 - 110	101 - 96	28 - 24
1141- 1035	128 - 107	59 - 55	138 - 134	27 - 24

الفصل الثالث

البكتريا المتعايشة تكافليا مع النيماتودا الممرضة للحشرات
Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacterium

تنتشر البكتيريا الممرضة للحشرات في الطبيعة وتشمل بشكل رئيسي عدة انواع من أجناس *Bacillus*، *Xenorhabdus* ، *Pseudomonas* ، *Serratia* ، *Brevibacillus*، *Peanibacillus* و*Photorhabdus* وتسبب هذه البكتريا أمراضا للحشرات إجبارية أو أختيارية ولهذه البكتيريا مدى عائلي وآليات للعدوى مختلفة وكل منها متشابه القدرة على إنتاج عوامل التاثير للتغلب على الاستجابات المناعية للحشرات وميكروباتها المضيفة. تظهر البكتريا *Photorhabdus* و *Xenorhabdus* تعايش إجباري مع الاطوار المعدية IJs للديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs للاجناس *Steinernema Heterorhabditis,* وتقضي هذه البكتريا جزء من حياتها داخل جسم هذه الديدان الخيطية والتي تكون ناقلات فعالة لعدوى الحشرات حيث توجد في حويصلة متخصصة تسمى الوعاء والموجوده في الجزء الأمامي من القناة الهضمية، اما الديدان الخيطية التي ليس لديها مثل هذا الهيكل المتخصص فتستخدم التجويف المعوي لإيواء البكتيريا. دورة حياة جميع البكتريا المتعايشة مع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs متشابهة ويمكن تقسيمها إلى ثلاث مراحل: محملة في العائل المتعايشة معه (الديدان الخيطية) Phoretic، ممرضة في جسم الحشرة Pathogenic و مترممة في مومياء الحشرات Saprophytic.

تعتبر البكتيريا *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* (شكل 1) من السهل زراعتها في المختبر والمعزولة من الحشرات المصابة أو من تجويف الأمعاء من الاطوار المعدية IJs للديدان الخيطية بشكل طبيعي، كما تنمو في وسط Luria-Bertani ولكنها بحاجة لزيادة وقت الزرع. البكتيريا التكافلية مع الديدان الخيطية EPNs لم يتم العثور عليه مطلقًا حرة في التربة ومع ذلك تم اكتشافها في الكائنات الحية البكتيرية ليرقات الحشرات في الدراسات الميتاجينومية. إن الديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs المتعايشة جنبًا إلى جنب مع البكتيرية الخاصة بها معروفة باستخدامها على المدى الطويل في مجال المكافحة الاحيائية والمتكاملة لإدارة الآفات حيث أنها تظهر فعالية كمبيد حشري ضد مجموعة واسعة من الحشرات التي تعيش في التربة والمفصليات الأخرى.علاوة على ذلك، طورت الدراسات هذه الكائنات باعتبارها أنموذج بيولوجي ذو صلة في مجالات بيئة التربة، تكافلي العلاقات. في الآونة الأخيرة أثارت البكتيريا *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* إلى إمكانية استخدامها لإدارة الآفات الزراعية ومكافحة البعوض.



شكل 1. البكتريا الممرضة للحشرات *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* المتعايشة تكافليا مع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs.

بعض الصفات للبكتريا التعايشية Xenorhabdus و *Photorhabdus*

تنتمي البكتيريا *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* إلى عائلة Enterobacteriaceae داخل Gammaproteobacteria وهما ليسا الوحيدتين لـγ-Proteobacteria المتعايشة تكافليا مع الديدان الخيطية، فتشير البحوث المنشورة إلى أن *Moraxella osloensis* التي تتبع (عائلة *Pseudomonadaceae*) ممكن ان تتعايش تكافليا مع الديدان الخيطية *Phasmarhabditis hermaphrodita*، في حين أن البكتريا الممرضة للحشرات *Serratia* sp التي تتبع عائلة *Enterobacteriaceae* يمكن ان ترتبط تكافليا مع النيماتودا *Oscheius* و *Caenorhabditis* والتي حققت نجاحا كمسببات لأمراض الحشرات. على الرغم من أن هذه الكائنات التكافلية ليس بالضرورة ان تكون اجبارية لكن لها القدرة على التعايش مع الديدان الخيطية .

أثبتت الدراسات أن البكتريا *Photorhabdus* و *Xenorhabditis* هما الاقرب للتعايش التكافلي مع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs *Steinernema* و *Heterorhabditis* والتي تشكلان مجموعة قريبة لبعضهما كشقيقين اما البكتريا التي تتبع الجنس *Proteus* تكون قريبة اليهما نوعما. تشيرالأدلة الحالية إلى أن لهذه للبكتيريا تاريخ مشترك قبل 200-500 مليون سنة مضت وكانت قادرة على الارتباط مع كل من النيماتودا الممرضة للحشرات *Steinernema* و *Heterorhabditis* كعوائل مضيفة لهما، ولكن تحت الضغط الانتخابي و التفاعلات المتبادلة طويلة الأمد مع الديدان الخيطية العائل المضيف فقد اعتبرا جنسان منفصلان من البكتيريا وكشفت الدراسات أيضًا أن الاتجاه العام في السلالات البكتيرية EPN آخذ في الازدياد بسبب التطور المرتبط بين التاثير والقدرات على إنتاج البكتريوسين. مظهريا تعتبر بكتريا *Photorhabdus* و *Xenorhabditis* سالبة غرام Gram- Nagative، لاهوائية، أختيارية ولاتشكل سبورات وتتشابه في بعض الصفات مع عائلة *Enterobacteriacae* بما في ذلك عدم قدرتها على خفض النترات Nitrate إلى النتريت Nitrite وهي الصفة الإيجابية الرئيسية لهذه العائلة وهناك صفة اخرى فريدة من نوعها لهذه الاجناس من البكتريا فهي تختلف في نمطها الظاهري بوجود الشكل الابتدائي والثانوي منها، كما ان تاثير المحفزات البيئية والدور المتبادل بين نوعي الخلايا في دورة الحياة التعايشية مع النيماتودا الممرضة للحشرات هو غير واضح. في الآونة الأخيرة ظهرت معلومات جديدة حول الاختلافات بين شكلي الخلية الابتدائي والثانوي ادت الى صياغة فرضية مفادها أن الخلايا الأولية غير قادر على إعادة الارتباط بالديدان الخيطية و يمكنها العيش بحرية في منطقة الرايزوسفير. أما البكتيريا من الجنس *Photorhabdus* فهي موجبة للكاتليز catalase ومتوهجة بايولوجيا bioluminescence وبالتالي يمكن تمييزها بسهولة من بكتيريا جنس *Xenorhabdus* بموجب هاتين الصفتين وتعد القدرة على التوهج البيولوجي bioluminescence هي الصفة المظهرية الأكثر خاصية في تمييز البكتيريا *Photorhabdus* عن بكتريا الجنس *Xenorhabdus*. عموما ان البكتريا *Photorhabdus* هي البكتريا الوحيدة القادرة على الإضاءة الحيوية bioluminescence المعروفة في الكرة الارضية القادرة على إنتاج الضوء ومع ذلك فأن وظيفة هذه السمة في *Photorhabdus* غير واضحة كما اشارت بعض الدراسات الى انخفاض قدرة هذه البكتريا في انتاج الضوء طيلة فترة التطور لهذه البكتريا مقارنة بنظيراتها التي تعيش في بيئة مائية وقد تفقد تدريجيا تحت ظروف الانتقاء الارضي.

بعض الانواع الاخرى من البكتريا المتعايشة مع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs

تحمل النيماتودا *Metarhabditis blumi* و *Metarhabditis adenobia* بكتيريا تكافلية Symbiotic bacterium توفر ألغذاء الأساسي سواءاً لها أو للنيماتودا المضيفة، عزلت ثلاث أنواع من البكتيريا، *Alcaligenes faecalis*، *Flavobacterium sp* و *Providenica vermicola* من الأطوار المعدية للنيماتودا ودرست التأثيرات المرضية للبكتيريا ضد يرقات الطور الرابع من دودة الشمع *Galleria mellonella* فأظهر النوعين لكل من *P. vermicola* و *Flavobacterium sp* معدل قتل بنسبة 100٪ بعد 48 ساعة من المعاملة بالبكتريا بينما أظهر النوع *A. facealis* معدل قتل أقل من 30٪.

النيماتودا *Steinernema*spp. و *Heterorhabditis bacteriophora*

تعد الديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs التي تتبع الجنس *Steinernema* والجنس *Heterorhabditis* والمتعايشة تكافليا مع البكتريا *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* هي من مسببات الامراض المميتة للافات الحشرية. حاليًا ، يتم استخدام EPNs تجاريًا لادارة الآفات الحشرية الهامة التي تهاجم أجزاء النبات فوق وتحت سطح الأرض.هذه النيماتودا تشكل مرحلة معدية دائمة يمكن تخزينها لفترات طويلة يتم تطبيقها بواسطة طرائق الرش التقليدية ويستمر تواجدها لاحقا في التربة بعد اجراء عملية التطبيق. بالإضافة إلى ذلك فهي خاصة بالحشرات وآمنة للكائنات غير المستهدفة بما في ذلك البشر والفقاريات والنباتات الأخرى وغير ملوثة للبيئة مما أدى إلى إعفاء هذه النيماتودا EPNs من ضمن اليات التسجيل لمبيدات الآفات في الولايات المتحدة والعديد من دول الاتحاد الأوروبي.

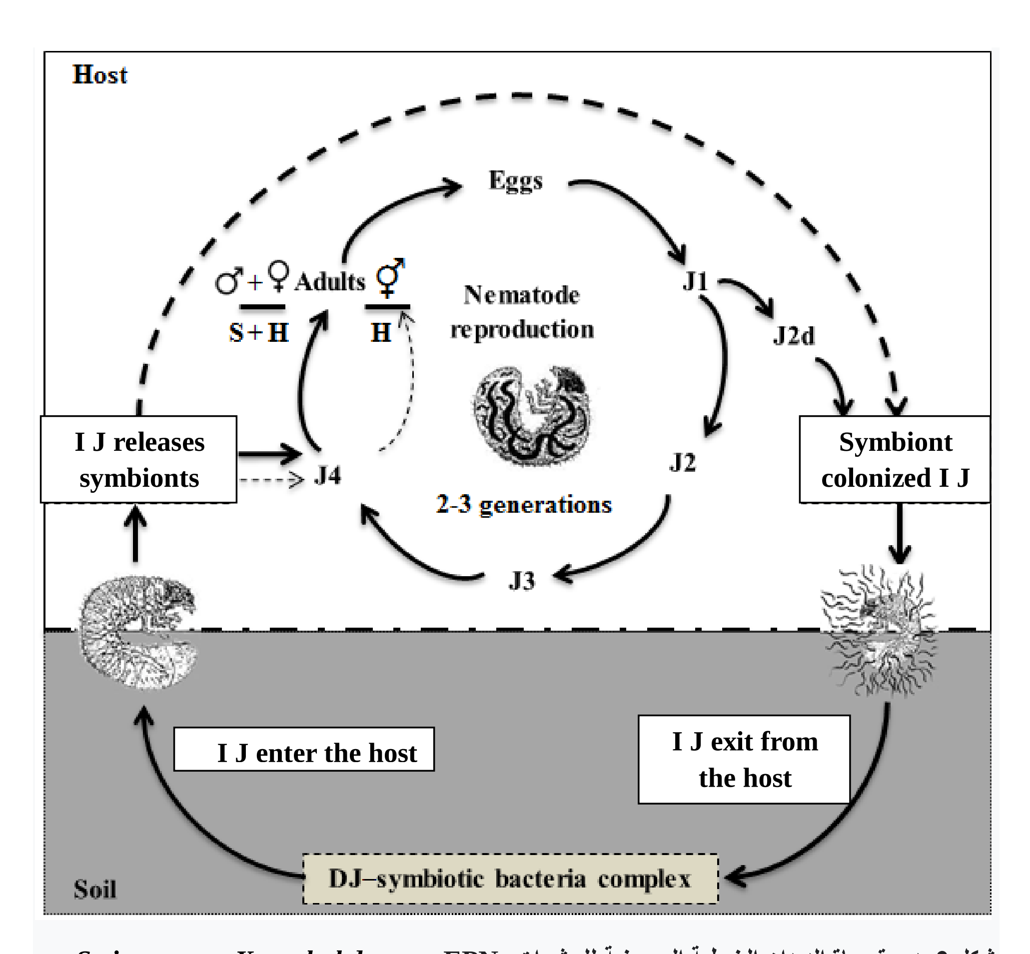
الانواع المسجلة للنيماتوداالممرضة للحشرات

تم الكشف عن العديد من انواع الديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs في دول العالم حيث ادرج 63 نوع تحت الجنس *Steinernema* و 17 نوع تحت الجنس *Heterorhabditis* حيث تم وصفها وذلك لغاية 2012 ثم ازدادت لاحقا الى 90 ، 20 نوع لكل منها لغاية 2016، ولكل منها صفات بيولوجية هامة في التكاثر والتحمل والاستجابة للاجهادات البيئية المختلفة من اجل الاستخدام كعوامل مكافحة احيائية وقد بذلت الكثير من الجهود من اجل تحسين صفاتها وفاعليتها المفيدة في التكاثر. ومن بين الانواع المسجلة والموصوفة يتم حاليا انتاج القليل منها بكميات كبيرة لاغراض تجارية من قبل اربع شركات تستعمل المفاعلات الحيوية Bioreacters لهذا الغرض وهذه الانواع هي *Heterorhabditis bacteriophora*، *Steinernema carpocapsae*، *S. feltiae* و *S. kraussei* والمتعايشة تكافليا مع البكتريا *X. bovienii luminescens* و *P. luminescens* المتعايشة مع النيماتودا ولهذه الانواع قابلية السيطرة على مجموعة واسعة من الافات الحشرية. صنفت النيماتودا *S. riobrave* و *S. yirgalemense* ضمن مجموعة *bicornutum*-group واثبتت فاعلية عالية ضد انواع من السوس وحشرة الارضة واثبتت قابلية عالية على تحمل درجات حرارة

التربة ودرجات البرودة لذلك يمكن اعتبارها وسائل واعدة في اعمال المكافحة الاحيائية لعديد من الافات الحشرية وقد اجريت عليها تطبيقات حقلية في كينيا وجنوب افريقيا واثبتت فاعلية عالية ضد انواع من البق الدقيقي والسوس والكثير من الافات الحشرية ذات الاهمية الاقتصادية في جنوب افريقيا.

دورة حياة النيماتودا الممرضة للحشرات

تمر دورة حياة النيماتودا الممرضة للحشرات والبكتريا المتعايشة معها بالعديد المراحل (شكل 2) تقضي جزءا كبيرا منها في التغذية والتكاثر داخل العائل المصاب، الاطوار المعدية IJs هي المرحلة الوحيدة التي تعيش بشكل حر وفي كلا الجنسين *Steinernema* و *Heterorhabditis* والذي يتم الانتقال فيهما من عائل الى اخر بواسطة الطور المعدي IJs التي لها القابلية على البقاء حية داخل التربة وغزوا العائل من خلال الفتحات الطبيعية : المخرج، الفم والفتحات التنفسية وفي بعض الحالات عن طريق الجلد، يحتوي الطور المعدي 200 – 2000 خلية بكتيرية متعايشة في امعائها حيث تستجيب للمؤشرات الكيمائية في الطعام داخل العائل فتطلق البكتريا التعايشية مما يؤدي لقتل العائل خلال 24 – 48 ساعة وتحول البكتريا جسم الحشرة المصاب الى غذاء للنيماتودا فتنمو وتتكاثر داخل مومياء الحشرة المصابة.



شكل 2. دورة حياة الديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs *Steinernema–Xenorhabdus* spp و *Heterorhabditis–Photorhabdus* spp عند اصابتها يرقات الخنافس التابعة لعائلة Scarabaeid وخروج الاطوار المعدية Dauer juveniles (Infective Juvenils) :

J1 – J4 = المراحل التطورية الاربعة

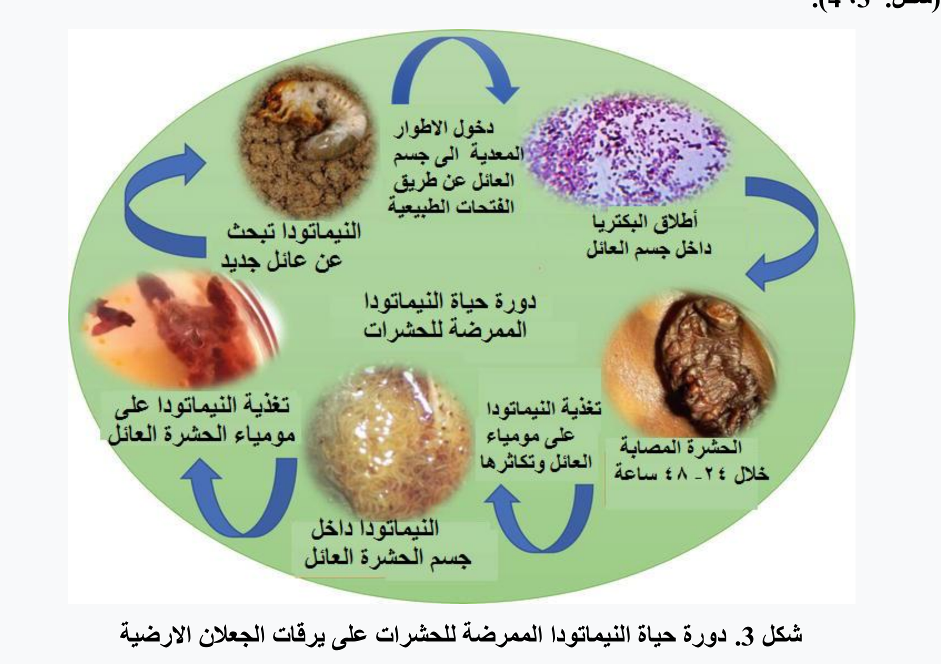
♂= ذكر Male، ♀ = أنثى Female، ⚥ = خنثى hermaphrodite

دور ماقبل الطور المعدي IJ2 (J2D)

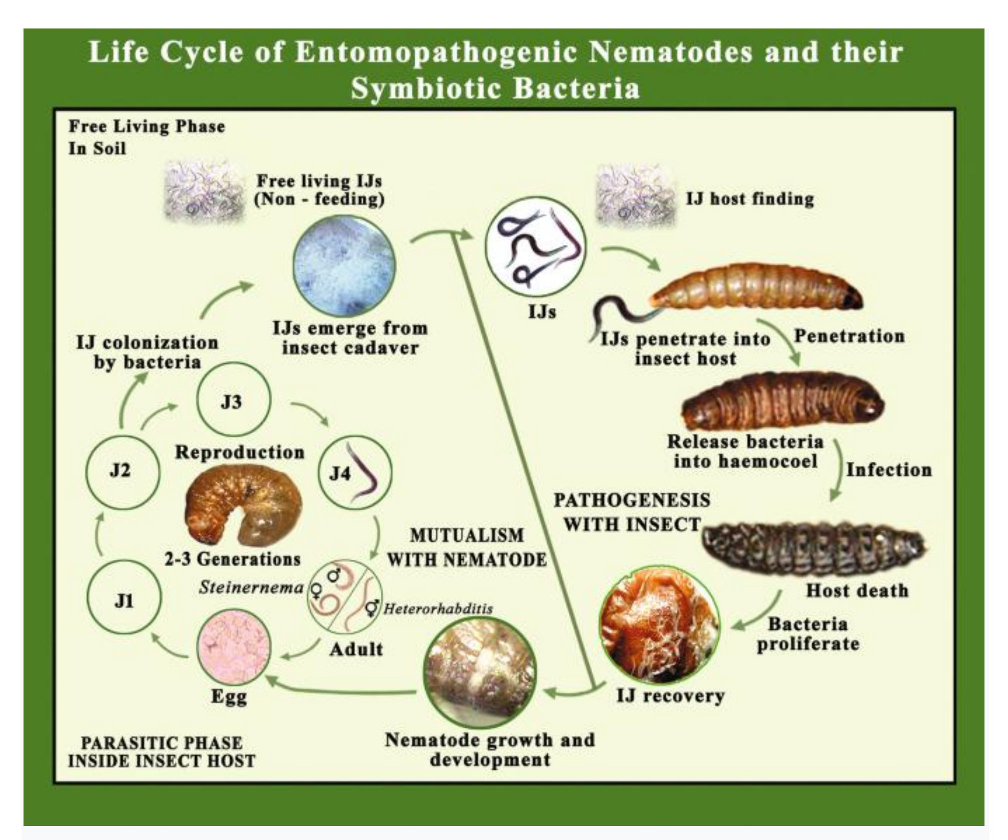
S = *Steinernema*; H = *Heterorhabditis*

عن/ Temesgen, A., D. and Dangila, Ä. 2016

عند حصول أشارات اطعام تنطلق من هيمولمف الحشرة عندها تستانف النيماتودا التغذية وتسمى هذه المرحلة بالتغذية وهي مرحلة استرداد الاطوار المعدية IJs وعندها تكمل النيماتودا دورة حياتها باربع مراحل تطورية فينتج عنها ذكورا واناث في الجنس *Steinernema* بينما ينتج عن الجنس *Heterorhabditis* خناث فقط (شكل. 3، 4).



شكل 3. دورة حياة النيماتودا الممرضة للحشرات على يرقات الجعلان الارضية

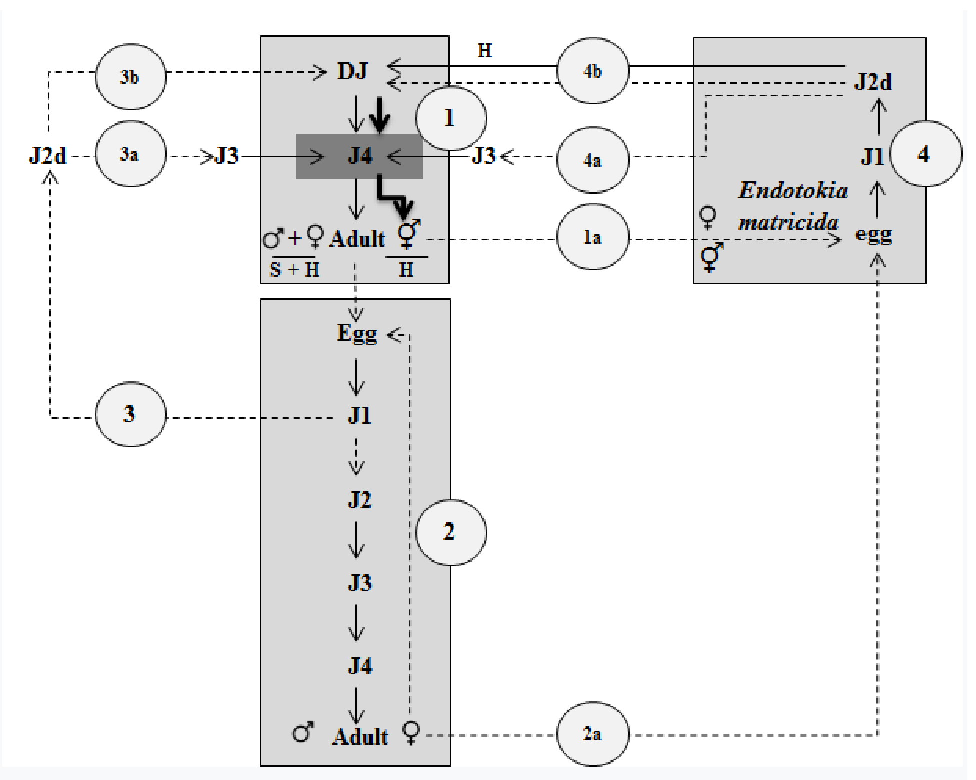


شكل 4. دورة حياة النيماتودا الممرضة للحشرات والبكتريا المتعايشة معها واطلاق الاطوار المعدية.

مسارات دورة حياة النيماتودا الممرضة للحشرات

تكمل الديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs تطورها في عدة مسارات مختلفة إعتمادا على توفر الغذاء داخل جسم العائل المصاب ويستمرالى جيلين أو أكثر حتى نفاذ الطعام (الحشرة المصابة) اعتمادا على حجم جسم العائل المصاب ثم تخرج للبحث عن عائل اخر، المسار الاول في الظروف البيئية غير الملائمة (شكل 4) مثل قلة الغذاء فتستمر عملية وضع البيض داخل الجسم وتحصل عملية أحتباس البيض وفقسه داخل رحم الام حتى أستهلاك جسم الام الانثى أو الخنثى من خلال الية **Endotokia matricida** و **Endotokia matricida** وذلك لضمان استمرار الجيل اللاحق، وتعد هذه الخطوة من الاهمية في عملية الانتاج الواسع للنيماتودا الممرضة للحشرات، اما المسار الثاني (شكل 4) يحصل في الظروف الملائمة التي تساعد على النمو وتكاثر البالغات سواءا داخل جسم الحشرة العائل او الاغذية الاصطناعية فيحصل بكثافة عالية عند التربية على الاوساط السائلة ولكن عند قلة اعداد النيماتودا يؤدي ذلك الى انخفاض مستوى فرمونات الديدان الخيطية مما يؤثر في انتاج الطور المعدي IJs. المسار الثالث يحصل نتيجة أستنفاذ المصادر الغذائية والتي يتسبب عنها تجمع سكان النيماتودا وزيادة انتاج فرمون النيماتودا حيث يتطور J1s الى J2D واخيرا DJs كما هو مبين في (الشكل b4). ويحصل المسار الرابع عند فقس البيض الى J1 داخل رحم الاناث من جيل الاباء او الابناء او الخناث على حساب جسم الام على غرار المسار (شكل 4 a)، أن اي تغيير في ظروف الوسط الغذائي او

زيادة كثافة البكتريا التعايشية في الوسط الغذائي السائل يسبب انخفاض في انتاج الاطوار المعدية وهذا مايحصل في النيماتودا *S. carpocapsae* و *S. feltiae*



شكل 4- a . المسارات المختلفة لدورة حياة النيماتودا *Steinernema* و *Heterorhabditis* حيث تمثل المسارات المتصلة مراحل تطور الزامية اما المسارات المنقطة تمثل مسارات بديلة، الارقام داخل الدوائر تمثل التسلسل العام لمراحل التطور ابتداءا من الطور المعدي IJ:

J1 – J4 = المراحل التطورية الاربعة

♂= ذكر Male، ♀ = أنثى Female، ⚥ = خنثى Hermaphrodite

دور ماقبل الطور المعدي IJ2 (J2D)

***Steinernema* = S, *Heterorhabditis* = H**

عن/ Temesgen, A., D. and Dangila, Ä. 2016

العوامل التي تؤثر في أنتاج نسل النيماتودا الممرضة للحشرات

من اجل تحقيق النجاح في الانتاج الكمي للنيماتودا الممرضة للحشرات وبشكل اقتصادي ووقت قصير وباقل كلفة يجب فهم مسارات وعوامل النمو المختلفة التي تساعد في تطوير النيماتودا الممرضة للحشرات وتحسين انتاجها على الاوساط السائلة والتي تبدء من عزل البيض، انتاج السموم الاحادية Monoxenic ،

ماقبل انتاج البكتريا التكافلية ومن اجل تحسين الانتاج الكمي على الاوساط السائلة يجب الالمام بمعرفة افضل الديناميكيات لكل من النيماتودا والبكتريا المتعايشة معها ويعد هذا من الجوانب الضرورية في ذلك، سابقا تم تقييم العديد من التجارب لتقييم ديناميكيات سكان النيماتودا والبكتريا المتعايشة معها والتي ربيت على اوساط سائلة والذي يعد جانبا ضروريا في ذلك. سابقا تم تقييم العديد من البحوث التي اجريت في مزارع سائلة فتم تقييم ديناميكيات سكان كل من ***Steinernema-Xenorhabdus*** و ***Heterorhabditis – Photorhabdus***. وقد سجلت اختلافات بين أنواع النيماتودا في عدد النسل الناتج وسجل أعلى أنتاج للنيماتودا لكل أنثى أو خنثى وباعلى كثافة للبكتريا (20×10^{9} خلية مل$^{-1}$ لكل نوع معين متعايش) قد بلغت 813 ، واكثر من 1900 و 269 فرد لكل من ***S. feltiae***، ***S. riobrave*** و ***H. bacteriophora*** على التوالي، اما عدد الذرية للانثى الواحدة للنيماتودا ***S. yirgalemense*** عند بكتريا تعايشية ***X. indica*** 10×10^{9} خلية مل$^{-1}$ قد بلغت 314 فرد فقط. أن الوسط الغذائي المستعمل في تكاثر البكتريا له تاثير كبير على الذرية الناتجة للنيماتودا ففي النيماتودا ***S. feltiae*** و ***S. riobrave*** أستعمل وسط غذائي سائل غني بالمغذيات بينما استعمل وسط فقير بالمغذيات في النيماتودا المتعايشة ***S. yirgalemense*** وقد يكون هذا بسبب ان النيماتودا ***S. feltiae*** و ***S. riobrave*** قد استفادت من استهلاك المواد غير مستغلة من مكونات الوسط الغذائي التي يتم انتاجها من البكتريا التعايشية كما ان الوسط الغذائي الذي يحتوي تراكيز عالية من المغذيات يؤدي الى انتاج خلايا بكتيرية ذات جودة عالية.

تنتج النيماتودا الممرضة للحشرات نسلها اما من وضع بيض خارج الرحم **(Extra-uterine)** او من بيض داخل الرحم **Endotokia matricida (Intra-uterine)**، خلال وقت معين تضغط النيماتودا على عضلات الفرج لوضع مجاميع من البيض ويتم ذلك خلال اليوم الاول او الثاني من حياة النيماتودا يبدء انتاج النسل من البيض من خلال البيض الموجود داخل الرحم **Endotokia matricida** بغض النظر عن الكثافة السكانية للبكتريا، على الرغم من التاثير الايجابي العالي للكثافة السكانية للبكتريا على الانتاج الكلي للنسل لكن لم تلاحظ فروقا معنوية في نسبة انتاج النسل من **Endotokia matricida** ومع ذلك فان هذه النسبة عن طريق **Endotokia matricida** قد انخفضت من 53% الى 39% ، 66% الى 28% و 77% الى 64% في كل من ***S. feltiae*** ، ***S. riobrave*** و ***H. bacteriophora*** على التوالي مع زيادة عدد كثافة الخلايا البكتيرية التعايشية من 5×10^{9} خلية مل$^{-1}$ الى 20×10^{9} خلية مل$^{-1}$ وهذا يبين دور التركيز الحرج من البكتريا، ان السبب الرئيسي للاختلافات بين انواع النيماتودا في انتاج النسل يرتبط بحجم جسم انثى النيماتودا الام فمع زيادة كثافة البكتريا يزداد حجم المبيض بشكل كبير وان جميع انواع النيماتودا التي درست وجد فيها ارتباط وثيق ايجابي بين كثافة البكتريا وانتاج النسل.

معدل نمو البكتريا

لقد وجد ان النيماتودا التي تحتوي بكتريا 20×10^{9} خلية مل $^{-1}$ للانواع ***S. riobrave, S. yirgalemense* and *H. bacteriophora*** غالبا تضع البيض بعمر 4.5 يوم اعتبارا من الطور الاول J1 بينما النيماتودا ***S. feltiae*** تضع البيض بعد 4 ايام من ذلك وبعد 24 ساعة من حضانة البيض يكتمل الفقس ويخرج الطور الاول، لاتلعب البكتريا المتعايشة مع النيماتودا اي دور في مدة جيل النيماتودا الممرضة للحشرات **EPNs.**

تأثير التزاوج على انتاج نسل النيماتودا *H. bacteriophora*
Influence of mating on offspring production in *H. bacteriophora*

اشارت البحوث المنشورة الى عدم وجود اختلافات في كمية النسل الناتج بين النيماتودا ***H. bacteriophora*** ذاتية الاخصاب (الخنثى) **Hermaphrodites** او المتزاوجة (ذكور و أناث)، وبلغ اعلى عدد من الافراد 394 للخنثى ذاتية الاخصاب بينما الاناث من نوع **Amphimictic** تنتج 52 فردا فقط.

معدل مدة بقاء الديدان الخيطية
Average survival of maternal nematodes

أن مدة بقاء القابلية الانجابية لاناث النيماتودا ***Steinernema* spp** والخنثى **Hermaphrodites** للنوع ***H. bacteriophora*** لاتتأثر بالكثافة السكانية للبكتريا المتعايشة معها، كما ان مدة بقاء أناث النيماتودا الام للجنس ***Steinernema* spp** على قيد الحياة تزداد قليلا مع زيادة الكثافة السكانية للبكتريا وقد سجل معدل أعلى لبقاء للنيماتودا ***H. bacteriophora*** على قيد الحياة اعلى قليلا مقارنة بالنيماتودا ***Steinernema* spp** وعند نفس الكثافة السكانية للبكتريا التعايشية وكلا الجنسين سواءا الاناث ام الخنثى للجنسين من النيماتودا لم تتجاوز مدة بقائهما اكثر من 8.1 يوم. ان الوقت اللازم لوصول النيماتودا الى مرحلة البلوغ لايختلف بين جميع انواع النيماتودا الممرضة للحشرات مع وجود اختلافات طفيفة اطول قليلا في خناث النوع ***Steinernema* spp** ولم تتاثر بالكثافة السكانية للبكتريا المتعايشة معها كما وجد ان النيماتودا ***H. bacteriophora*** من مجموعة **Hermaphrodites** ان التزاوج والكثافة السكانية للبكتريا لاتاثير معنوي لهما على موت الخنثى واطلاق الاطوار المعدية **IJs**. لقد انتجت اناث ***H. bacteriophora*** 98% من نسلها (52 لكل انثى) اي ان نسبة بقائها كانت عالية.

الفصل الرابع

التنوع الجزيئي بين البكتريا المتعايشة مع النيماتودا الممرضة للحشرات
Molecular diversity among EPN symbionts

استخدم التسلسل الجيني المتكرر **Frequently gene sequences** لمقارنة وتقييم التنوع الجيني لـ للبكتريا ***Xenorhabdus*** و ***Photorhabdus*** وكذلك الانواع الاخرى، وقد ازداد استخدام تحليلات الجينوم الكامل **Full genome sequences** بشكل كبير في دراسة التنوع البيولوجي والعلاقات التطورية بين انواع بكتريا النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs، وفي الواقع يعتبر استخدام تسلسل الجينوم الكامل **Full genome sequences** في تحديد الاختلافات بين التعايش الدقيق **Microsymbionts** لكشف الاختلاف الجيني الكبير بين البكتريا ***Xenorhabdus*** و ***Photorhabdus*** ذو اهمية كبيرة في هذا المجال.

من الواضح الان، أن جينوم بكتريا الديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs **Genomes of EPN bacteria** تشفر مضادات حيوية متنوعة **Antibiotics: Adhesins, Hemolysins ، Proteases، Lipases** والتي تعتبر عناصر اساسية لنجاح غزوا العائل المضيف (الحشرات) وتحويلها بيولوجيا الى مومياء **Insect Cadaver**. وفي الواقع ان التحليل الجينومي للبكتريا ***P. luminescens*** والكشف عن الجينوم **TT01** وكشف ترميز **6%** من التسلسل الجيني أدى الى تسليط الضوء على أمكانيات لاكتشاف عقاقير جديدة من هذه البكتريا وأثبتت الدراسات ان العديد من الجينات السمية في بكتريا ***Xenorhabdus*** و ***Photorhabdus*** وجدت مع الامراضية الارضية لهذه البكتريا والمكتسبة التي من المحتمل ان تنتقل بشكل افقي وان الجينات التعايشية المتبادلة بين البكتريا والنيماتودا تظهر تباينا كبيرا فيما بينها

خصائص العلاقات التكافلية والتطور المشترك بين البكتريا التعايشية والنيماتودا العائل

Specificity of symbiotic relationships and coevolution between bacterial symbionts and their nematode host

لخصوصية العلاقات التكافلية والتطور المشترك بين البكتريا والنيماتودا العائل لها اكبر الاثر في مجال التفاعلات التكافلية بينهما وهناك خصوصية قوية لها فائدة لكلا الطرفين المتعايشة تنعكس على تحقيق النجاح والانتقال من خلال زوج من النيماتودا من عائل الى عائل أخر من الحشرات. من المفترض ان كل نواع من انواع جنس النيماتودا ***Steinernema*** يكون علاقة تعايشية مع نوع واحد من انواع جنس البكتريا ***Xenorhabdus*** ولكن في الحقيقة ان عدة انواع من جنس البكتريا ***Xenorhabdus*** لها علاقات تعايشية مع عدة انواع من النيماتودا التي تتبع الجنس ***Steinernema***، في المقابل فان النيماتودا ***Heterorhabditis-Photorhabdus*** لها علاقات تكافلية أكثر مرونة مع البكتريا مقارنة مع العلاقات الاخرى بين انواع النيماتودا والبكتريا والكثير من النتائج تدعم هذا النمط من الخصوصية والاليات الكامنه ورائها ولكنها لاتزال بحاجة الى توضيح.

الأساليب المستخدمة في التصنيف والتعرف على البكتيريا التكافلية للنيماتودا الممرضة للحشرات EPNs

Approaches used for taxonomy and identification of EPN symbiotic bacteria

في البداية ، كانت الخصائص التكافلية والصفات المظهرية هي المعايير الرئيسية التي استخدمت للتمييز بين انواع البكتريا التكافلية المتعايشة مع النيماتودا الممرضة لحشرات وبموجب ذلك صنفت الى مجموعتين منفصلتين هما البكتيريا *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* بعد ذلك تم أستخدام منهج متعدد الجوانب للتصنيف بدائيات النوى Prokaryotes يستند على التكامل بين معايير مختلفة من الصفات المظهرية والبيانات الجينية يتبعه تحليل تسلسل الجينات الرنا الرايبوسي rRNA gene sequence وتهجين الحمض النووي/الحمض النووي 165DNA/DNA Hybridization (DDH)، والتي أصبحت "المعيار الذهبي" في التصنيف للبكتيريا وعن طريق هذا المعيار تم التوصل الى عتبة التشابه بنسبة 97% ثم تغيرت لاحقا الى 98.7% وبهذا تم التعرف على الانواع الجديدة من البكتريا التكافلية المتعايشة مع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs. وفي الوقت نفسه، حصل تطور سريع في مجال تقنية تسلسل الجينات Gene Sequencing Techniques وغيرت نهج التعريف على انواع البكتريا التكافلية المتعايشة مع النيماتودا الممرضة للحشرات بعد ان اصبح من الواضح أن استخدام نظام الوحيدات الريبوسومية المتسلسل Solely Ribosomal Subunit Sequences لأغراض التصنيف غير مناسبًا بسبب التباين القليل بين الانواع ونقل الجينات الجانبي Lateral Gene Transfer (LGT) بين أنواع بكتيرية مختلفة. وللتغلب على قوة العلاقة والنشوء بين البكتريا *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* فتم تطوير اطار عمل من خلال مقارنة تسلسل ترميز الجينات Sequences of Gene Coding الخاصة بالبروتينات المعروف فعلها والتي تسمى جينات التدبير المنزلي Housekeeping genes والتي تعتمد بشكل كبير للاستدلال على علاقات النشوء والتطور للنيماتودا المتعايشة مع البكتريا وحاليا حصل تقدم في استعمال تقنية الحمض النووي المتسلسل DNA الذي يستخدم فيه الجينوم الكامل لاغراض التصنيف.

لمحة تاريخية في تغيرات تصنيف البكتريا *Xenorhabdus* و *Photorhabdus*

Changes in the taxonomy of Xenorhabdus and Photorhabdus - historical overview

عزلت البكتريا التكافلية Symbiotic bacteria لاول مرة من النيماتودا *Steinernema carpocapse* ووصفت عام 1965 من قبل (Poinar and Thomas, 1965; 1966) وسميت حينها *Achromobacter nematophilus* ونقلت لاحقا الى الجنس *Xenorhbdus* واعيدت تسميتها الى *Xenorhabdus nematophilus* واخيرا سميت *Xenorhabdus nematophila* كي تتوافق مع التسمية البكتريولوجية، بينما عزلت البكتريا التكافلية المتوهجة من النيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora* ووضعت تحت الجنس Xenorhabdus وسميت *Xenorhabdus luminescensens* وذلك عام 1979. في عام 1993 كان هناك نوعين فقط من البكتريا التكافلية تتبعان الجنس *Xenorhabdus* المتعايشة مع الديدان الخيطية الممرضة للحشرت وهما *Xenorhabdus nematophila* و *Xenorhabdus luminesces* المتعايشة مع النيماتودا الممرضة للحشرات *Steinernema* و *Heterorhabditis* على التوالي، ومع ذلك فان كثير من الاختلافات المعنوية في الصفات المظهرية والجزيئية بين النوعين قد ادى الى انتقال جميع النيماتودا *Heterorhabditis* الى الجنس الجديد *Photorhabdus* كنوع *Photorhabdus* luminescens، على الرغم من التجانس الكبير بين *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* وسرعان ما اصبح لها عدة انواع *X. nematophila*، *X. bedding*، *X. bedding* و*X. bovienii* وفي 2007 سجلت قائمة من 20 نوع تتبع الجنس *Xenorhabdus* ولاحقا 26 نوع عند استخدام تقنية التتابع الجيني Genome sequence data.

بعد اكتشاف الجنس *Photorhabdus* في 1993 وصفت ثلاث انواع من هذا الجنس *P. luminescens, P. temperata,* و *P. asymbiotica* أما في 2014 فقد وصف النوع *Photorhabdus heterorhabditis* المتعايش مع النيماتودا *Heterorhabditis zealandica* كما ظهرت لاحقا عدة أنواع وتحت انواع منها *Photorhabdus bodei*، ومؤخرا أشارت البحوث المنشورة الى أن الجنس *Photorhabdus* يتبعه 19 نوع منها *Photorhabdus laumondii* و *Photorhabdus luminescens* و *Photorhabdus khan*.

بعض الانواع الاخرى من البكتريا المتعايشة مع النيماتودا الممرضة للحشرات

Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacterium

تحمل النيماتودا *Metarhabditis blumi* والنوع الثاني *Metarhabditis adenobia* بكتيريا تكافلية Symbiotic Bacterium توفر ألغذاء الأساسي سواءاً لها أو للنيماتودا المضيفة،عزلت منها ثلاث أنواع من البكتيريا، *Alcaligenes faecalis*، *Flavobacterium sp* و *Providenica vermicola* من الأطوار المعدية للنيماتودا ودرست التأثيرات المرضية للبكتيريا ضد يرقات الطور الرابع من دودة الشمع

Galleria mellonella **فأظهر النوعين** ***P. vermicola*** **و** ***Flavobacterium sp*** **معدل قتل بنسبة 100٪ بعد 48 ساعة من المعاملة بهذين النوعين بينما أظهر النوع** ***A. facealis*** **معدل قتل أقل من 30٪.**

بعض الصفات للبكتريا المتعايشة مع النيماتودا ***M. blumi*** **و** ***M .adenobia***

- ***A. faecalis***: **بكتريا سالبة الجرام، أسطوانية الشكل، قطرها 0.5 – 1.0 ميكرومتر × 0.5 هوائية، درجة الحرارة المثلى لنشاطها بين 20 – 37 درجة سيليزية.**
- ***Flavobacterium*** **sp لونـها أصفر.**
- ***P. vermicola*** **سالبة الجرام، موجبة لليوريز، وقادرة على الحركة، حجم المستعمرة من 1.8 إلى 2.2 ملم لونـها أبيض.**

كانت نسبة أنواع البكتيريا الثلاثة المتعايشة مع طور معدي واحد IJ من كل نوع من النيماتودا هي: 5 خلايا بكتيرية من النوع ***P. vermicola*****، خلية واحدة من النوع** ***A. faecalis*** **وخلية بكتيرية واحدة من النوع*****Flavobacterium*** **sp.**

أظهرت البكتيريا التكافلية للديدان الخيطية الممرضة للحشرات (النيماتودا) EPNs كنموذج مناسب لدراسة التفاعلات بين الكائنات الحية الدقيقة والعوائل المظيفة. وعلى الرغم من أن الكثير من الاهتمام في البكتريا ***Xenorhabdus*** **و** ***Photorhabdus*** **تاريخيا كان مدفوع لدراسة علاقتها التكافلية مع الديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs لكن اصبح من الواضح الان معروف الكثير من الايض الثانوي لهذه الانواع من البكتريا من خلال ارتباطاتها التكافلية مع النيماتودا وهذا بدوره سوف يسرع الى الكثير من النتائج، وبناءا على التقدم الذي حصل في علم التطور الجزيئي Molecular phylogeny وتسلسلات الجينوم Genome sequences المتاحة فأن تصنيف البكتريا التكافلية المسببة للامراض في الحشرات ادى الى اعادة تقييم الديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs، حيث تم رفع العديد من تحت الانواع الى مستوى الانواع وتسمية اصناف جديدة منها ورغم ذلك فان المعرفة الحالية بتنوع هذه البكتريا وتسلسلها التصنيفي وخصوصية العلاقات التكافلية لها مع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs لاتزال محدودة وهناك العديد من الانواع الجديدة من النيماتودا الممرضة للحشرات لم يتم وصف علاقاتها التكافلية مع البكتريا لحد الان. لذلك لابد من بذل الكثير من الجهود لزيادة المعرفة بتوزيع انواع البكتريا** ***Xenorhabdus*** **و** ***Photorhabdus*** **المرتبطة بالعائل وكذلك موقعها واصلها الجغرافي وأن تنفيذ هذا كله سيؤدي بدوره الى تطور المعرفة لتوزيع هذه الانواع مع عوائلها واصلها الجغرافي، وان تنفيذ ذلك سيبين طرق النشوء والتطور لهذه الانواع بالاستناد الى الجينوم بشكل خاص وتوفير معلومات وافية حول الصفات الاساسية والاصل لهذه الاجناس البكتيرية.**

العلاقة التكافلية بين النيماتودا الممرضة للحشرات والبكتريا المتعايشة معها

عزل النيماتودا الممرضة لحفارات النخيل

عزل نوعين من النيماتودا متعايشة مع حفارات النخيل ألتي تتبع الجنس *Oryctes*، ألنوع الأول *Metarhabditis blumi* والنوع الثاني *Metarhabditis adenobia* المنتشر في بيئة بساتين النخيل في العراق، شخصت هذه الأنواع مورفولوجيا بالأستناد على الصفات المورفولوجية للجسم و جزيئياً بأستعمال نظام تتابع متسلسل Sequence عالي الأداء وقاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI) وتجارب العبور في التزاوجات Crossing experiments للتأكد بأنهما نوعين مستقلين، وعند أستعمال المصايد البيضاء white trap تبين وجود هذه الأنواع في الأعضاء التناسلية للذكور والأناث (شكل 5) وهذا مايفسر كيفية أنتقال هذه الأنواع من النيماتودا بين الحشرات المصابة والسليمة عند التزاوج بعيداً عن بيئة التربة، شخصت هذه الأنواع في مراكز عليمة دولية (قسم النيماتولوجي في جامعة شمال داكوتا الأمريكية ومعهد علم الحيوان والبايولوجي / المانيا).



شكل 5. النيماتودا *Metarhabditis adenobia* داخل الأعضاء التناسلية لأنثى خنفساء وحيدة القرن العربية *Oryctes agamemnon arabicus*

الفصل الخامس

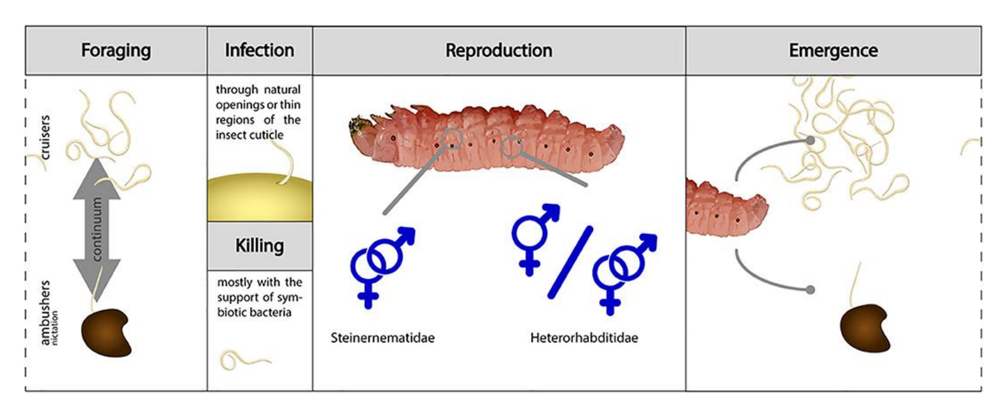
أهمية مرحلة الطور المعدي Infective Juvenile في دورة حياة النيماتودا الممرضة للحشرات

Important of Infective Juvenale inLife cycle of Entomopathogenic nemadode

تتضمن دورة حياة معظم النيماتودا المراحل التالية: مرحلة البيض، وأربع مراحل يافعة، ومرحلة البلوغ تسمى المرحلة الثالثة من الديدان الخيطية الممرضة للحشرات على أنها مرحلة الدور المعدي Infective Juvenile أو Dauer وهي المرحلة الوحيدة للعيش الحر خارج الجسم وهو قادر على ألبقاء على قيد الحياة في التربة والأنسجة النباتية، حيث يحدد مكان الآفات الحشرية ويهاجمها ويصيبها. في ظل الظروف المثلى تستغرق دورة الحياة من 3 إلى 7 أيام لإكمال دورة حياة واحدة داخل العائل من البيضة إلى البيضة. يتطلب ظهور الأدوار ألمعدية من العائل حوالي 6-11 يوماً (شكل 1 و 2) هو رسم تخطيطي لدورة حياة النيماتودا الممرضة للحشرات من عدوى العائل إلى الخروج من العائل. يتغذى الدور المعدي IJعلى البكتريا وتمثيلها الأيضي الناتج من التغذية على العائل، ويتحول إلى المرحلة الرابعة ثم للذكور والإناث من الجيل الأول. بعد التزاوج تضع الأنثى بيضاً يفقس في مرحلة أولى أدواراً يافعة (IJ) ألتي تتساقط على التوالي إلى يوافع المرحلة الثانية - الثالثة والرابعة ثم للذكور والإناث من الجيل الثاني. تتزاوج النيماتودا البالغة وتنتج بيضاً وتتحول إلى الجيل الثاني، تتوقف الأدوار المتقدمة بالعمر الناتجة من المرحلة الثانية عن التغذية، وتدمج داخلها حبيبة من البكتيريا في الغرفة البكتيرية، ويحتفظ بغلاف المرحلة الثانية كغمد ويترك الجثة بحثاً عن عائل جديد.



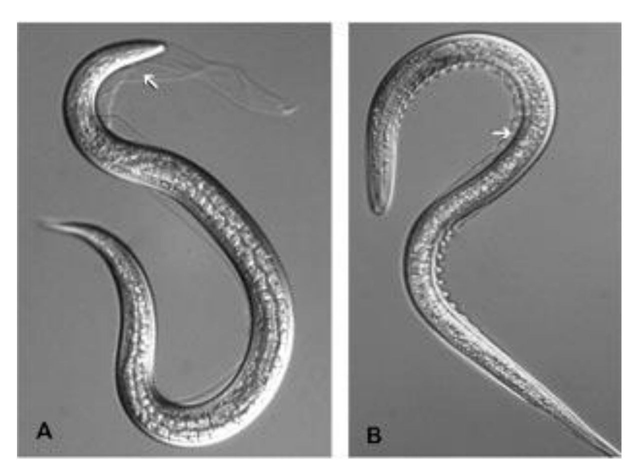
شكل 1. مخطط يوضح إنتقال النيماتودا الممرضة للحشرات من عائل إلى أخر.



شكل 2. مخطط يوضح مراحل أصابة العائل بالنيماتودا الممرضة للحشرات وخروج الاطوار المعدية IJs

ماهو الطور المعدي Infective Juvenile

يُطلق على الطور الثالث من دورة حياة النيماتودا الممرضة للحشرات EPN أسم الطور المعدي (IJ) Infective Juvenile لأنه يبدأ العدوى في مضيفه، الطور المعدي يكون في مرحلة عدم التغذية ويتواجد بشكل حر في التربة أو الأنسجة النباتية ولكن جميع المراحل الأخرى بما في ذلك الرابعة والخامسة (البالغ) والبويضة هي في الواقع (توجد في جسم الحشرة المضيفة) ويطلق أحيانا على الطور الثالث أسم Dauer (شكل 3 ، 4 ، 5).



شكل 3. الطور الثالث المعدي **Infective Juvenile** للنيماتودا الممرضة للحشرات **EPNs**. (A) ***Steinernema carpocapsae***، (B) ***Heterorhabditis bacteriophora***. تصوير **Ursula Kölzer**



شكل 4. الاطوار المعدية Infective Juvenile تخرج من بقايا جسم حشرة مصابة بالنيماتودا الممرضة للحشرات.



شكل 5. الاطوار المعدية Infective Juvenile تخرج من بقايا جسم حشرة مصابة بالنيماتودا الممرضة للحشرات.

طريقة حساب الاطوار المعدية IJs التي تنتجها النيماتودا الممرضة للحشرات
وبحسب طريقة المتبعة من قبل Mwaniki *et al* 2010

1 - 10 طبق (9 × 3.5) يوضع فيها فلتر ابيض مخطط Whatman وللمعاملة الواحدة.

2 - يزود كل طبق ب 100 IJs من النيماتودا قيد الدراسة (المعاملة الاولى).

3 - يزود كل طبق ب 200 IJs من النيماتودا قيد الدراسة (المعاملة الثانية).

4 - تزود النيماتودا (الموجوده في الطبق) ب 1 مل ماء مقطر.

5 - تترك النيماتودا في الاطباق لمدة 30 دقيقة كي تتوزع على الفلتر.

6 - يزود كل طبق بيرقة واحدة طور ثالث من يرقات دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella*.

7 - تنقل الاطباق الى الحاظنة على درجات حرارة 18 – 25 س^0 ورطوبة نسبية 60% وتترك لمدة ثلاثة ايام.

8 - توضع مومياء اليرقة على المصايد البيضاء لاستخلاص وتنقية النيماتودا التي خرجت.

9 - تجمع النيماتودا لمدة سبعة ايام وتنظف بالصب والترسيب.

10 -تحسب النيماتودا لكل معاملة تحت المكرسكوب فائق التكبير binocular microscope لكل معاملة

ملاحظة :

1 - يسجل لون اليرقة بعد المعاملة ولكل مرحلة من المراحل خلال الايام السبعة.

2 - اليرقات الحديثة العمر تموت اسرع من اليرقات المتقدمة بالعمر.

ألإمراضية للنيماتودا الممرضة للحشرات

درست الإمراضية للنيماتودا *M. blumi* و *M.adenobia* على بعض الآفات الحشرية في المختبر والبيوت المحمية الزراعية ولوحظ أن نسبة القتل تزداد بزيادة الوقت. تدخل الأطوار المعدية (IJs) من النيماتودا إلى جسم يرقات حفارات أل *Oryctes* من خلال الفم وفتحة الشرج والفتحات التنفسية أو عن طريق الأختراق المباشر من خلال البشرة، إذا كان وضع الدخول عن طريق الفم فتخترق الديدان الخيطية جدار الأمعاء لتصل إلى الهيمولمف، وعندما تصل الأطوار المعدية IJs إلى الهيمولمف في اليرقات فإنها تطلق البكتيريا الممرضة المتعايشة معها إلى جسم العائل والتي تتكاثر بسرعة في الهيمولمف، عادة ماتموت يرقات الحفارات في غضون 48 إلى 72 ساعة (الشكل 6). على الرغم من أن البكتيريا هي المسؤولة بشكل أساسي عن موت اليرقات، إلا أن الديدان الخيطية تنتج أيضًاً سمّاً مميتًا لليرقات. تتغذى الاطوار المعدية IJs على نواتج التمثيل الأيضي الناتج عن البكتريا، وتتحول إلى المرحلة الرابعة ثم للذكور والإناث من الجيل الأول. بعد التزاوج تضع الإناث بيضها ألذي يفقس في مرحلة أولى أطوار يافعة ألتي تتطور تباعا إلى المرحلة الثانية والثالثة والرابعة ثم للذكور والإناث من الجيل الثاني، تتزاوج البالغات الناتجة عن الجيل الثاني وتتسرب خارج جسم العائل الذي يبقى بشكل مومياء.



شكل 6. تطور إصابة يرقات حفارات النخيل التابعة للجنس *Oryctes* بالنيماتودا *Metarhabditisa denobea* تحت ظروف المختبر.

ألية إصابة الحشرات بالنيماتودا الممرضة

عندما تجد النيماتودا المتحركة المعدية العائل، فإنها تدخل جسم العائل من خلال الفتحات الطبيعية للحشرة (الفم، المخرج والفتحات التنفسية) (شكل 7)، بعد ذلك تخترق طبقة خلايا البشرة وتدخل الهيمولمف ثم تطلق النيماتودا المعدية ألتي غزت هيمولمف البكتيريا التكافلية المعوية الخاصة بها إلى هيمولمف الحشرة، تلعب هذه البكتيريا دورًا مزدوجاً في كبح ألنظام المناعي للحشرة من أجل حماية نفسها وحماية النيماتودا ألتي تستضيف البكتريا. من ناحية أخرى تحفز الحشرات المصابة العمل المناعي الخلوي والهرموني من أجل حماية نفسها من البكتيريا المسببة للأمراض والديدان الخيطية. تتعرف الأستجابة المناعية للحشرات على الغزو الخارجي عن طريق بروتينات خاصة للتعرف على الأنماط المناعية ويتم تسليم معلومات للتعرف أليها في المواقع المحيطة بمواقع الأستجابة ويحصل ذلك وفق ألية تسمى **Eicosanoids**. من خلال هذه العملية، يتم تحفيز الأستجابة المناعية بشكل منهجي. يمكن للنيماتودا البكتيرية **EPN** وهي بكتيريا تكافلية أن تثبط الأستجابة المناعية للحشرات وتسبب البكتيريا منع التخليق الحيوي للإيكوسانويدات في الحشرات، ونظرًا لأن البروتينات السامة للبكتيريا غير مستقرة بأستثناء النيماتودا الممرضة للحشرات لذلك يمكن أكثار النيماتودا الممرضة للحشرات وأستخدامها كمبيدات حشرية أحيائية. علما أن الإنتاج الواسع متاح الآن ويمكن تخزين النيماتودا الممرضة للحشرات لفترة طويلة.

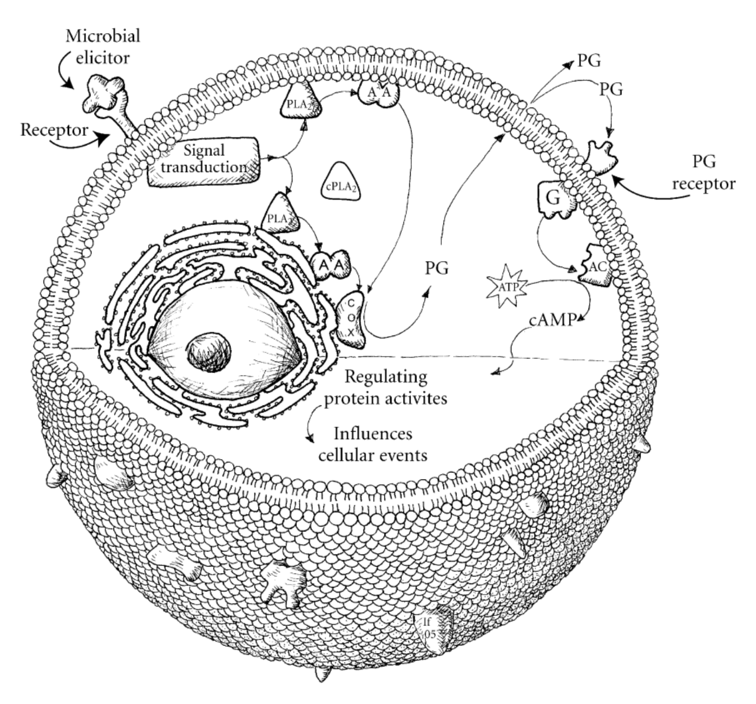
نموذج لدورة حياة النيماتودا الممرضة للحشرات



شكل 7.الية اصابة الحشرات بالنيماتودا الممرضة للحشرات الموجودة تحت سطح التربة

ماهو أل Eicosanoids

أل **Prostaglandins** و **Eicosanoids** ذات الصله هي مستقبلات أوكسجينية لبعض الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة ذات العشرون ذرة كاربون C20. ومن الأفضل فهم ألية **Eicosanoids** في سياق أهميتها السريرية في الطب البشري والتطلع الى رؤيا جديدة وأوسع للإيكوسانويدات والتي كانت تسمى "النموذج البيولوجي" في ظل هذا الرأي، نلاحظ أن **Eicosanoids** قد تم معرفتها في إشارات خلوية قبل وقت طويل من أصول أل **Metazoa**. أثناء التنوّع التطوري للحيوانات، تم تجنيد الإيكوسانويدات في مجموعة من الأدوار البيولوجية بعضها يحدث فقط في الحشرات واللافقاريات الأخرى. تمنح هذه الإجراءات المتعددة الإيكوسانويدات قوة تفسيرية غير عادية في فهم الظواهر البيولوجية. نستعرض أدوار **Eicosanoids** (شكل 8) في قسمين من مجالات بيولوجيا اللافقاريات: وساطة تفاعلات الحشرات المناعية للبكتيريا والتفاعلات بين الطفيليات المضيفة. على نطاق واسع، تلعب **Eicosanoids** أدواراً مهمة في المستويات الخلوية والعضوية والبيئية للتنظيم البيولوجي. أن التحقيق المستمر في أهمية **Eicosanoids** سوف يؤدي الى رؤى جديدة مهمة في بيولوجيا الحشرات حيث لم تكن معروفة سابقا قبل 2013 بل كانت معروفة فقط على الجنس البشري والثدييات.



شكل 8. Eicosanoids

التخليق الحيوي للأكوسانويدات Eicosanoids وتأثيره في وظائف المناعة الخلوية للحشرات

أل Eicosanoid هو مصطلح عام لجميع الأنشطة البايولوجية وتخليق حامض الاراكيدونيك Arachidonic acid، وأثنان آخرين من الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة ذات أل 20 ذرة كاربون C20. هناك ثلاث مجموعات رئيسية من الإيكوسانويدات هي البروستاجلاندين Prostaglanids (PGs) و سميت هكذا لأنه تم أكتشافها لأول مرة في السوائل المنوية ألتي تنتج في غدة البروستات هي نتاج مسارات انزيمات الأكسدة الحلقية، السيتوكروم Cytochrome P_{450} ألتي تنتج عن مسارات Epoxygenase "Epoxygenase pathways" لأنتاج حامض Epoxyeicosatrieonic. أن مختلف مسارات Lipoxygenase هي المسؤولة عن التخليق الحيوي لمجموعة واسعة من المركبات بما في ذلك الليكوترين Leukotrienes وأحماض هيدروكسي أيكوساتيترايونك Hydroxyeicosatetraenoic acids. أن واحده أو أكثر من أهم مجموعة أل Eicosanoid الرئيسية أكتشفت في أنسجة الثدييات وسوائل الجسم، حيث تعمل كوسيط دهني للاتنشطة الخلوية، ومن بين أهم فعاليات أل Eicosanoids هي نقل الأيونات فسيولوجيا و تعمل كوسيط في تقلص أو أسترخاء العضلات الملساء ولها تأثيراً هائلاً في آليات دفاع العائل. في عام 1982 حصل Johan Vane على جائزة نوبل في الطب أو علم وظائف الأعضاء وذلك عن أكتشافه للتأثيرات المسكنة للأسبرين الناتجة عن تثبيط تخليق البروستاجلاندين Prostaglandin. أطلق هذا الاكتشاف مشروعًا بحثيًا دوائياً كبيراً للغاية يهدف إلى أكتشاف عقاقير جديدة مضادة للألتهابات غير ستيرويدية، والتي تعمل جميعها من خلال تأثيرها المثبط على التخليق الحيوي لل Prostaglandin وتشتهر هذه المركبات بفاعليتها المهمة في فسيولوجيا الثدييات وأمراضها. مؤخراً كشفت الأبحاث الحديثة عن وجود الإيكوسانويدات Eicosanoids وفاعليتها البيولوجية في الحشرات والعديد من الحيوانات اللافقارية الأخرى، في الحشرات

تتوسط الإيكوسانويدات المناعة الخلوية لتحدي الميكروبات والميتازوا، والجدير بالذكر إن بعض الكائنات الحية المعدية تفرز العوامل المسؤولة عن إضعاف ردود الفعل المناعية للحشرات المضيفة عن طريق تثبيط التخليق الحيوي للإيكوسانويدات كما تعمل أل Eicosanoids أيضًا في البيولوجيا التناسلية للحشرات، وفي فسيولوجيا النقل الأيوني، وفي أستجابة الحمى للعدوى وكذلك في إفراز البروتين في الغدد اللعابية للقراد، ولل Eicosanoid دور مهم في نقاط حاسمة في دورة حياة الحشرات كالإصابات المعدية وفعاليات التكاثر.

تأثير الأنواع البكتيرية على كفاءة النيماتودا:

تم تقييم كفاءة النيماتودا *M. blumi* وفقًا للأنواع البكتيرية الثلاثة المرتبطة بها، حيث تمت تربيتها في معلق بكتيري بدون أي مغذيات، بالنسبة لجميع الأنواع البكتيرية الثلاثة، تأثرت أعداد النيماتودا بشكل كبير بالتركيز البكتيري الأولي. عندما زاد التركيز الأولي للبكتيريا من 1.5×10^{10} إلى 6.0×10^{10} خلية / مل ، تراوح الحد الأقصى لعدد النيماتودا لكل مليلتر من 2.4×10^4 إلى 5.2×10^4 مع *P. vermicola* ، ومن 2.1×10^4 إلى 4.3×10^4 مع *Flavobacterium* sp. ومن 1.4×10^4 إلى 2.4×10^4 مع *A. faecalis*. وفي جميع الحالات، كان المعدل المتزايد لعدد النيماتودا متناسبًا مع المعدل المتناقص المقابل للتركيز البكتيري وتم الحصول على أعلى إنتاج للديدان الخيطية 5.2×10^4 نيماتودا / مل عند 72 ساعة مع *P. vermicola*. بدأ عدد النيماتودا في الإنخفاض عندما وصل تركيز البكتيريا إلى 1.0×10^9 خلية / مل، والذي يعتبر الرقم البكتيري الحرج لنمو النيماتودا.

تاثير العوامل اللاأحيائية في النيماتودا الممرضة للحشرات

في التجارب المختبرية والزراعة المحمية والحقلية، ثبت إن العديد من العوامل اللاأحيائية لها تأثير في نشاط وحركة وتواجد النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs وتشمل العوامل الفيزيائية أو الكيميائية (على سبيل المثال: التربة، الرطوبة، درجة الحرارة، درجة الحموضة والملمس والبنية والكثافة الظاهرية للتربة أو الوسط الذي تتواجد فيه النيماتودا) وكذلك العوامل الناتجة عن الأنشطة البشرية (على سبيل المثال: التغيرات الكيميائية أو الفيزيائية أثناء إدارة النظام البيئي مثل التسميد وأستخدام المبيدات ورطوبة التربة)، هو عامل غير حيوي حاسم يؤثر على سلوك النيماتودا EPN وفعاليتها والبقاء على قيد الحياة لأن النيماتودا تتطلب أغشية مائية ذات سماكة وأستمرارية كافية للسماح لها بالحركة.

العوامل الهامة التي تؤثر على فاعلية النيماتودا الممرضة للحشرات:

- **درجة الحرارة : 28 ± 2 درجة سيليزية**
- **الرقم الهيدروجيني 7.3 ± 0.01**
- **محتوى الأكسجين: 6 vvm (volume:volume:m). ويرتفع النشاط يرتفع عند الزيادة الى الحجم vvm20**

النيماتودا الممرضة للحشرات *Metarhabditis blumi* (Sudhaus 1974): ميزاتها ومواصفاتها
(Nematoda: Rhabditida)

في السنوات الاخيرة حصلت زيادة باستعمال النيماتودا الممرضة للحشرات في برامج المكافحة وذلك لتحقيقها عدة منافع:

1 - اكثر فاعلية من عوامل المكافحة الكيميائية.

2 - استمرار تواجدها في التربة.

3 - مستدامة.

4 - امنة الاستعمال بيئيا.

5 - لاتبدي الحشرات مقاومة لها.

6 - هناك زيادة في عدد الشركات التي تنتجها.

7 - متلائمة مع برامج المكافحة المتكاملة للافات

8 - سهلة التطبيق وتتلائم مع كافة معدات الرش

9 - امنة جدا على النبات .

10 -عزلت النيماتودا *M. blumi* من الخنفساء الشرقية Oriental beetle, *Exomola orientalis*.

11 -تدخل الى جسم اليرقة من الفتحات الطبيعية (الفم ، المخرج و الفتحات التنفسية) mouth, anus, spiracles.

12 -تحمل ثلاثة انواع من البكتريا الممرضة التي تسبب قتل العائل:

Alcaligenes faecalis, Flavobacterium, Providencia vermicola

13 -بعد دخول النيماتودا من الفتحات الطبيعية لجسم اليرقة تخترق الجدار الخلوي وتستقر في الهيمولمف ثم تطلق البكتريا التخصصية التعايشية.

14 -البكتريا عند اطلاقها في الهيمولمف توقف عمل الجهاز المناعي للحشرة وتحمي نفسها وتحمي النيماتودا كعائل للبكتريا وكذلك تثبط البكتريا التخليق الحيوي لل eicosanoids في الحشرات.

15 -درس تحليل التطور الجيني لهذه النيماتودا من خلال تشخيص البكتريا التعايشية باستعمال 16S rRNA gene PCR. لاغراض الدراسة يجمع الطور الثالث المعدي للنيماتودا باستعمال المصايد البيضاء ويخزن تحت التبريد بدرجة 10 س^0

16 -الية عمل البكتريا التعايشية:

عموما، عند اصابة الحشرات بالبكتريا يتحفز فيها النظام المناعي الخلوي والهورموني لحماية نفسها من البكتريا الممرضة والنيماتودا. الاستجابة المناعية للحشرات تتحسس للغزو بنمط البروتينات الخارجية وذلك باحاطتها ب eicosanoids وخلال ذلك تتحفز المناعة بشكل منتظم وها يحدث عند غزو النيماتودا لجسم الحشرة ولكن البكتريا التعايشية مع النيماتودا عندما تنطلق داخل هيمولمف الحشرة تثبط تخليق eicosanoids في الحشرات .

على اية حال، السم البروتيني للبكتريا غير مستقر عند استعمال المبيدات للبكتريا التعايشية عدا النيماتودا الممرضة للحشرات.

في بداية العمل بهذا المجال وعدم تطوره كان بسبب عدم معرفة وجود البكتريا التعايشية مع النيماتودا، بعدها تطور هذا العمل نحو الانتاج الواسع والخزن لمدة طويلة، فضلا عن ان قابلية اختراق الكائنات الدقيقة للعائل تعتبر عامل محدد لفاعليتها ولكن عندما حققت هذه النيماتودا نجاحا بقابليتها على اختراق جسم الافة استعملت كمبيدات احيائية على مستوى العالم.

المحاولة الاولى لاكثار هذه النيماتودا كانت عام 1984 باستعمال الميديا الصلبة باستعمال البولي ايثر-بولي يوريتان الاسفنجي الذي يحتوي الوسط الزرعي للنيماتودا. اما الاوساط الزرعية السائلة استعملت لاول مرة عام 1952 وذلك باستعمال خلاصة الكبد

مواصفات البكتريا التعايشية Species-Specific Bacteria

1 - البكتريا موجبة غرام تكافلية (تعايشية) لاتعيش حرة وانما تعايشية مع النيماتودا.

2 - عرضها 1 مايكرون وطولها 5 مايكرون تقريبا.

3 - واحد طور معدي من النيماتودا يحمل خمس خلايا من البكتريا التعايشية الممرضة علما ان ثلاثة منها كافية لاحداث قتل الافة.

و هناك انواع اخرى تحمل اكثر من هذا العدد ، مثلا طور واحد معدي من النيماتودا *Heterorhabditis bacteiophora* يحمل عشرة خلايا بكتيرية من البكتريا *Photorhbdus luminesces*

4 - انتاج floppy toxin ضروري لاحداث قتل الافة (الحشرات) وانقاص وزن العائل.

5 - 10^3 - 10^5 تركيز من الخلايا البكتيرية الثلاثة يسبب موت 100% للحشرات بعد يومين من المعاملة.

6 - درجة الحرارة ودرجة الحموضة مهمة في تربية وانتاج النيماتودا والبكتريا التعايشية.

7 - استعمال المضادات الحيوية مع الاطوار المعدية للنيماتودا يؤدي الى عدم موت الحشرات بينما تموت 90% من الحشرات تقريبا في حالة عدم استعمال المضادات الحيوية.

8 - تزداد فاعلية النيماتودا بشكل معنوي بزيادة تركيز البكتريا تؤدي لزيادة قتل الحشرات وبحسب المدى الاتي:

بشكل عام : 1.5×10^{10} to 6.0×10^{10} cells/mL

P. vermicola : 2.4×10^4 to 5.2×10^4 cells/mL

Flavobacterium sp: 2.1×10^4 to 4.3×10^4 cells/mL

A. faecalis : 1.4×10^4 to 2.4×10^4 cells/mL

عند زيادة تركيز النيماتودا يقل تركيز البكتريا وان اعلى تركيز للنيماتودا هو 5.2×10^4 لكل مل يحصل خلال 72 ساعة، وان اعداد النيماتودا تقل عندما يصل تركيز البكتريا الى 1.0×10^9 خلية / مل وهذا هو الحد الحرج لاعداد البكتريا التي تؤثر على نمو النيماتودا.

الفصل السادس

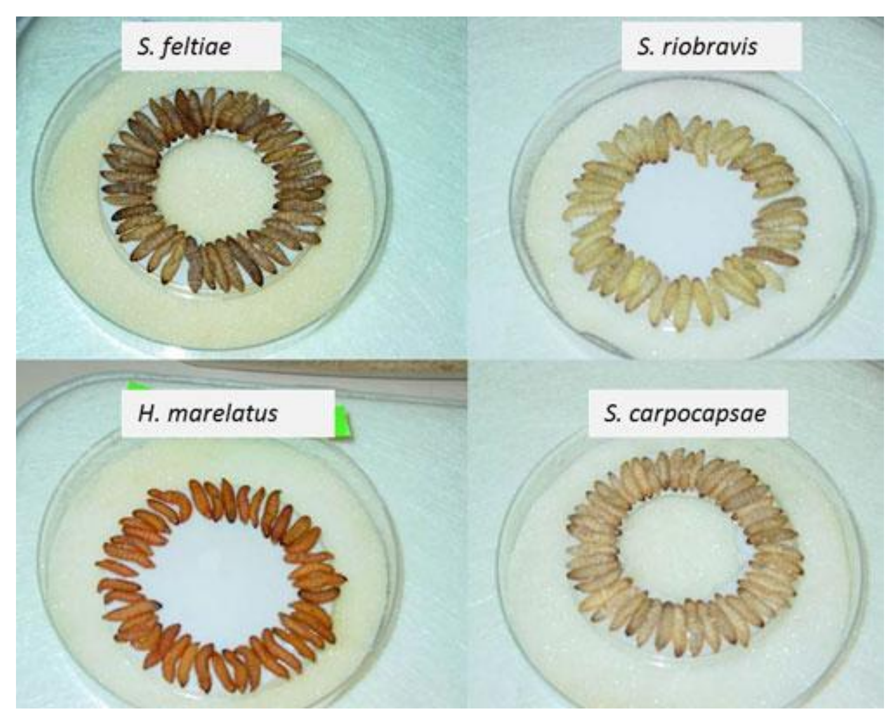
الانتاج وتكنولوجيا التطبيقات في النيماتودا الممرضة للحشرات
Entomopathogenic Nematode Production and Application Technology

تعد تكنولوجيا الانتاج والتطبيق أحدى الركائز الاساسية لنجاح إستعمال النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs في مجال المكافحة الاحيائية للحشرات، تتضمن وسائل الانتاج طرائق مختلفة منها داخل الجسم الحي In vivo وخارج الجسم الحي In vitro (التخمر السائل والصلب Solid or liquid fermentation). وتعد طريقة الانتاج داخل الجسم الحي هي ألاكثر شيوعا للاستعمال المختبري والتجارب الحقلية الصغيرة كما تعتبر هذه الطريقة مناسبة أيضا للاسواق المتخصصة وصغار المزارعين حيث لايحتاج ذلك الى عدد كبير من المتخصصين أو الى راس مال كبير وبنى تحتية كبيرة كما هو الحال في تكنولوجيا الانتاج خارج الجسم الحي. اما تكنولوجيا الانتاج خارج الجسم الحي فتستخدم لاغراض الانتاج الكمي الواسع وبجودة عالية وتكاليف معقولة وغالبا مايتم استخدام الاطوار المعدية IJs للنيماتودا الممرضة للحشرات من خلال معدات الرش المتنوعة وانظمة الري القياسية كما يمكن تحسين أليات التطبيق للنيماتودا من خلال تحسين اليات توصيلها الى الهدف المقصود مثل تطبيقات المومياء Cadaver application أو تحسين معدات الرش. في السنوات الاخيرة حصل تطوير كبير في مجال توليفات النيماتودا الممرضة للحشرات وخصوصا التطبيقات فوق سطح الارض وذلك بخلط النيماتودا مع المواد التي تخفض التوتر السطحي او البولميرات او مع المواد الهلامية القابلة للرش، كما يمكن استدامة النيماتودا بتعزيز توليفات الطعوم ومومياء الحشرات المصابة وهذا بدوره يقلل من اعداد النيماتودا المطلوبة لوحدة المساحة

طرائق الانتاج Production methods
طريقة الاستزراع داخل الجسم الحي In vivo culture method

النهج العام للاستزراع داخل الجسم الحي هو نظام ثنائي إما الانتاج في الصواني أو على الرفوف وهذا يعتمد اساسا على المصايد البيضاء White trap الذي يساعد على مسك الاطوار المعدية IJs التي تهاجر بعيدا عن مومياء الحشرة العائل المصابة Host-cadaver وهذا يتضمن حصاد الاطوار المعدية، تركيزها (عند الحاجة) وازالة التلوث بعدها توضع حشرات عائل في طبق أو صينية محاطة بورق ماص أو أي قاعدة أساسية تساعد هذه الحشرات والنيماتودا مثل التربة او اي مادة اخرى تساعد في ذلك. بعد حوالي 2 – 5 يوم تنقل الحشرات المصابة الى المصايد البيضاء (شكل 1، 2، 3) ويجب حصول تقدم في الاصابة قبل نقلها الى المصايد البيضاء حيث يزداد تمزق جسم الحشرة العائل المصابة وتزداد الاطوار المختلفة للنيماتودا، تتكون هذه المصايد من طبق او صينية توضع فيها اجسام الحشرات المصابة محاطة بالماء وان تكون بمساحة كبيرة عندها ستهاجر الاطوار المعدية مومياء الحشرة المصابة الى المصايد البيضاء ويتم حصادها ويمكن تطوير حجم وعدد المصايد البيضاء الى المستوى التجاري.





شكل 1. اكثار انواع مختلفة من النيماتودا الممرضة للحشرات Entomopathogenic nematodes داخل الجسم الحي in vivo على يرقات دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella*.




شكل 2. اكثار النيماتودا الممرضة للحشرات **Entomopathogenic nematodes** داخل الجسم الحي **in vivo** على يرقات سوسة النخيل الحمراء ***Rhynchphorus ferrugineus***.



شكل 3. اكثار النيماتودا ***Metarhabditis adenobia*** على يرقات حفار ساق الذرة ***Sesamia cretica***

العوامل التي تؤثر في حاصل النيماتودا عند الاستزراع داخل الجسم الحي

Factors affecting yield for in vivo culture

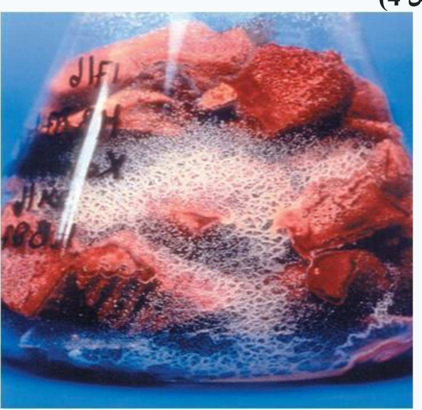
يعتمد حاصل انتاج النيماتودا عند الاستزراع داخل الجسم الحي على جرعة النيماتودا وكثافة الحشرة العائل فالجرعة القليلة من النيماتودا تؤدي الى قلة موت العائل وكذلك الجرعة العالية من النيماتودا تؤدي ايضا الى فشل احداث العدوى بسبب التنافس مع غزوا الاصابات الثانوية الاخرى ولتلافي ذلك تستخدم جرعات بتركيز متوسط للحصول على أعلى حاصل من النيماتودا فعلى سبيل المثال يستخدم 25 الى 200 طور معدي لكل يرقة واحدة من دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (بالاعتماد على نوع الديدان الخيطية وطريقة التلقيح) في حين ان الاعداد المطلوبة لدودة الذرة Mealworm, *Tenebrio molitor* هي 100 الى 600 طور معدي علما ان تراكم أعداد النيماتودا قد يؤدي الى حرمانها من الاوكسجين وتراكم الامونيا. عموما، تزداد أعداد العائل المصاب مع زيادة تركيز النيماتودا وتقل مع قلة أعداد العائل في وحدة المساحة. تختلف كمية النيماتودا عند أستعمال طريقة الاكثار داخل الجسم الحي اختلافا كبيرا بحسب نوع النيماتودا المستعملة ونوع الحشرة العائل وذلك بسبب الحساسية العالية لاغلب النيماتودا، توفرها الواسع، سهولة تربيتها وقابليتها على

الانتاج العالي للنسل وان العائل الاكثر شيوعا في التربية والاكثار داخل الجسم الحي هي يرقات دودة الشمع الكبرى *G. mellonella* كما اجريت العديد من البحوث لاغراض التطبيقات التجارية لانتاج النيماتودا الممرضة للحشرات باستعمال دودة الذرة *T. molitor* وهناك الكثير من العوائل الاخرى التي اجري عليها انتاج النيماتودا داخل الجسم الحي ومنها: دودة البرتقال orangeworm (*Ameylois transitella*) ، دودة التبغ tobacco budworm (*Heliothis virescens*)، cabbage looper (*Trichoplusia ni*)، pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*)، beet armyworm (*Spodoptera exigua*), corn earworm (*Helicoverpa zea*)، gypsy moth (*Lymantria dispar*)، cricket (*Acheta domesticus*) وانواع اخرى من الخنافس وعموما تتناسب كمية انتاج النيماتودا مع حجم جسم العائل المضيف ومع ذلك فان انتاج النيماتودا لكل ملغرام من الحشرة العائل وقابلية الاصابة بالعدوى تتناسب عكسيا مع حجم العائل وعمره وكذلك يتناسب حاصل الانتاج عكسيا مع حجم النيماتودا. ان اختيار نوع العائل المضيف وتكاليف اكثاره ونوع النيماتودا ومدى ملائمتها للعائل له تاثير عالي على حاصل انتاج النيماتودا وتكاليف انتاجه، كما يمكن أن تؤثر الظروف البيئية بما في ذلك درجات الحرارة المثلى والتهوية الكافية (الاوكسجين) والرطوبة على كمية حاصل النيماتودا كما يتاثر حاصل النيماتودا بكفاءة طريقة التلقيح حيث يستعمل لهذا الغرض سحب النيماتودا بالماصة أو رشها على جسم العائل أو غمرها بمعلق النيماتودا واحيانا تضاف النيماتودا مع غذاء الحشرات، وتعد طريقة غمر العائل في معلق النيماتودا من اكثر الطرائق شيوعا في ذلك من حيث الوقت ولكنها تتطلب مزيد من اعداد النيماتودا مقارنة بالطرائق الاخرى وذكرت التقارير بان إستعمال طريقة معاملة الغذاء بالنيماتودا لاحداث اصابة حشرة *T. molitor* بالنيماتودا *S. carpocapsae* كانت أكثر كفاءة مقارنة بالطرائق الاخرى. ومع ذلك تتطلب طريقة معاملة الغذاء خطوة إضافية تتضمن ازالة مومياء العائل المصاب تجنبا لعدم حصول تلوث للغذاء وبالتالي يجب اتخاذ قرار بشان طريقة التلقيح من ناحية تحليل كفاءة التكلفة.

طريقة المزارع الصلبة خارج الجسم الحي In vitro solid culture method

تعتمد طريقة أستزراع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs خارج الجسم الحي In vitro في الاوساط الصلبة على نقل النيماتودا الى مزارع نقية تحتوي وسط غذائي، في الاعمال السابقة يتم انشاء مزارع احادية السموم Monoxenic cultures معقمة سطحيا ويتم اضافة النيماتودا والبكتريا المتعايشة معها اليها، علما ان التعقيم السطحي غير كافي لاثبات بان المزرعة من نوع Monoxenic cultures لان البكتريا تعيش تحت كيوتكل الديدان الخيطية وبالتالي ذلك تطوير طريقة محسنة تتضمن وضع بيض النيماتودا على المزرعة النقية Pure culture. تم لاول مرة تطبيق المزارع الصلبة في مساحات ثنائية الابعاد مثل اطباق بتري يستخدم فيها اوساط غذائية مختلفة بعد ذلك تم استخدام المزارع الصلبة في المختبر بشكل واسع مع اختراع نظام ثلاثي الابعاد يتضمن زراعة النيماتودا على رغوة بولي يوريثان بولي إيثر Polyether polyurethane حيث يتم خلط الوسط السائل مع الرغوة وتعقيمها ثم تلقيحها بالبكتريا يتبعها النيماتودا ثم يتم حصاد النيماتودا في

غضون 2 – 5 أسبوع عن طريق وضع الرغوة على المناخل المغمورة بالماء وتكون المنتجات الحيوانية هي الاساس في هذه الاوساط الغذائية (لحم كلى الخنزير أو فضلات الدواجن) وتم تحسينه لاحقا باضافة مكونات مختلفة مثل الببتون، خلاصة الخميرة، البيض، طحين فول الصويا وشحم الخنزير وتم توسيع أنتاج ذلك باستعمال الاكياس المعقمة وضخ الهواء المرشح فيها وتم تطوير الانتاج الواسع من خلال ادخال العديد من الاجراءات التي تتضمن الاكياس مع اشرطة **Tyvac** المنفذة لغاز التهوية والخلط الآلي والتعقيم، والتلقيح المتزامن للديدان الخيطية والبكتيريا، وتكنولوجيا الغرفة المعقمة، والحصاد الآلي للنيماتودا والبكتريا من خلال الطرد المركزي والمناخل (شكل 4)





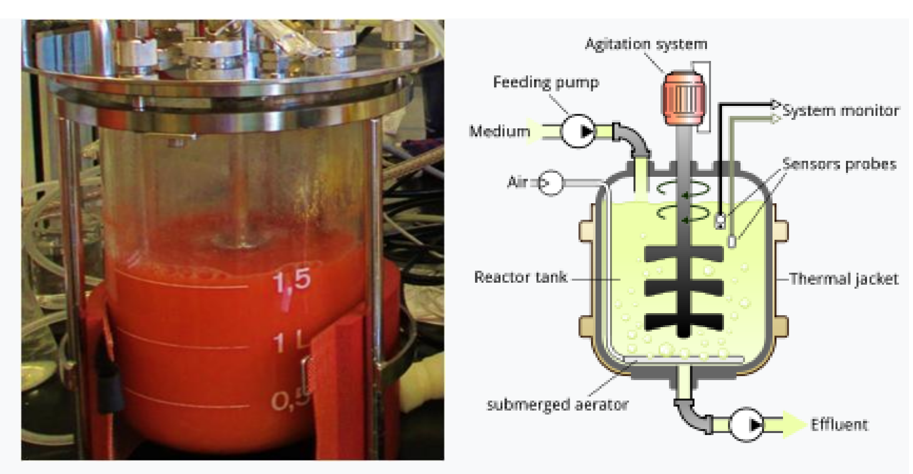
شكل 4. اكثار النيماتودا الممرضة للحشرات **Entomopathogenic** على الاوساط الصلبة خارج الجسم الحي **In vitro rearing sold culture**

العوامل المؤثرة في حاصل النيماتودا عند استخدام المزارع الصلبة
Factors affecting yield for in vitro solid culture

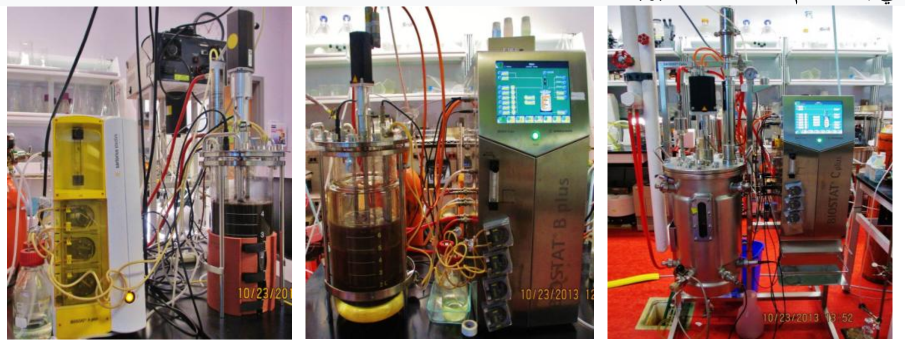
يتاثر حاصل النيماتودا بمعدل التلقيح بعدد الاطوار المعدية IJs لكل وحدة من الوسط الغذائي كما يتاثر الحاصل بسلالة الديدان الخيطية دون غيرها ويرتبط زمن أنتاج المزرعة على درجة الحرارة وبالتالي يجب تحسين ذلك باستعمال درجة الحرارة المثلى لذلك .ولتحقيق اكبر انتاج من النيماتودا من النوع او السلالة يمكن ان تؤدي زيادة كمية اللقاح الى زيادة نمو الديدان الخيطية وتقليل وقت الاستزراع ولكن يمكن ان توفر اوقات الاستزراع الطويلة الحصول على انتاج اكثر من النيماتودا وهذا يزيد في معدل موت الديدان الخيطية بمرور الوقت وهذا ما يتطلب التوازن بين وقت الاستزراع مع الكلفة وتناقص الانتاج. هناك تاثير كبير لمكونات الوسط الغذائي على كمية انتاج النيماتودا في المزارع الصلبة حيث تساعد الزيادة في كمية الدهون على زيادة انتاج النيماتودا لان مكونات الدهون تعكس تركيبة العائل الطبيعي للنيماتودا تصبح اكثر ملائمة لها، كما ان للمكونات الاخرى مثل الاملاح والبروتينات تاثيرا في انتاج النيماتودا.

طريقة المزارع السائلة خارج الجسم الحي In vitro liquid culture method

تواجه تطوير طريقة المزارع السائلة (أحادية السموم Monoxenic) خارج الجسم الحي لانتاج النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs تحديات كبيرة تتمثل بتوفير كمية كبيرة من الاوكسجين والذي يؤثر بشكل كبير على النيماتودا وتم في البداية معالجة هذه المشكلة بعمل فقاعات هوائية بالرش التنازلي أو استعمال مضخات الهواء كالتي تستعمل في أحواض تربية أسماك الزينة أو باستخدام التخمر الهوائي Airlift fermenter المقترن بنظام التحريض المتغير، لاحقا تم ادخال العديد من الابتكارات المختلفة في عملية الخلط والتهوية بما في ذلك ادخال المفاعلات الحيوية Bioreactors الداخلية والخارجية التي تحتوي حواجز موضوعة داخل الوعاء مما يشكل حلقة دوران داخلية واخرى خارجية منفصلة (شكل 5 ، 6 و 7). عموما في المفاعلات الحيوية يتم أدخال البكتريا اولا ثم لاحقا النيماتودا. تتكون الاوساط السائلة من عدة مكونات تتضمن: طحين فول الصويا، خلاصة الخميرة، زيت الشوكي، صفار البيض، كازئين، ببتون، حليب مجفف، خلاصة الكبد و كولستيرول تختلف أوقات الاستزراع باختلاف الاوساط الغذائية ونوع النيماتودا وقد تصل الى ثلاثة اسابيع كحد أقصى ولكن عموما أن العديد من الانواع يمكن أن تصل كحد اقصى في غضون أسبوعين أو أقل لانتاج الاطوار المعدية IJs والتي يمكن حصادها بالطرد المركزي بعد ذلك.

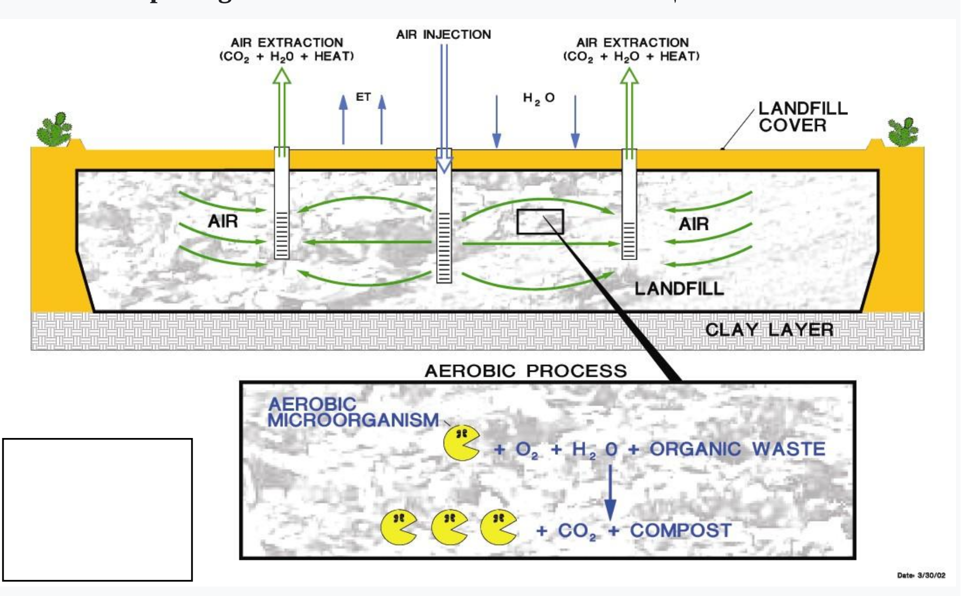


شكل 5. اكثار النيماتودا الممرضة للحشرات **Entomopathogenic** على الاوساط السائلة خارج الجسم الحي باستخدام المفاعلات الحيوية **Bioreactors**.



سعة 15 لتر　　　　سعة 10 لتر　　　　سعة 5 لتر

شكل 6. مفاعلات حيوية باحجام مختلفة لاكثار النيماتودا الممرضة للحشرات **Entomopathogenic**



شكل 7. تصميم لمفاعل حيوي هوائي لاكثار النيماتودا الممرضة للحشرات **Entomopathogenic**.

العوامل المؤثرة على الحاصل عند استخدام المزارع السائلة خارج الجسم الحي

Factors affecting yield for in vitro liquid culture

تشترك كل من النيماتودا *Steinernematids* و*Heterorhabditids* في متطلباتها الهوائية الكافية ولكنها تختلف فيما بينها في أستراتيجيات أنتاج أكبر حاصل بالاستناد على دورة حياة كل جنس وبايولوجي تكاثره، جنس ال *Steinernematids* (عدا نوع واحد) ذكورها واناثها لها القابلية على التزاوج في المزارع السائلة لذلك تطوير عملية التزاوج في المزارع السائلة أمر بالغ الاهمية يمكن تحقيقه من خلال تصميم المفاعلات الحيوية Bioreactor وتنظيم التهوية فيها، ولكن عملية تطوير التزاوج لاتنطبق على النيماتودا التي تتبع *Heterorhabditid* لان الجيل الاول ينتج عنه خنثى وعلى الرغم من أن الاجيال اللاحقة تحتوي أشكالا برمائية الا انها لاتستطيع التزاوج في الاوساط السائلة لذلك فان تطوير حاصل النيماتودا *Heterorhabditid* في المزارع السائلة يعتمد اساسا على خطوة أسترداد الاطوار المعدية IJs لبدء واكمال دورة حياتها، بينما تميل مستويات أسترداد هذه النيماتودا الى100% داخل الجسم الحي مقارنة ب 0 - 85% في المزارع السائلة ويمكن أن يتاثر انتاج النيماتودا بعوامل اخرى كالتهوية، ثاني اوكسيد الكربون، محتوى الدهون و درجة الحرارة، يتاثر أنتاج النيماتودا في المزارع السائلة بعوامل أخرى أيضا مثل محتويات الوسط الغذائي، كمية لقاح النيماتودا وجنس النيماتودا وتعتبر الدهون وكميتها من الجوانب الاساسية في الوسط الغذائي للنيماتودا عند اكثارها في المزارع السائلة كما سجل تاثير موجب لمحتوى الوسط الغذائي من الكلوكوز وخلاصة الخميرة وان معدل أعلى حاصل للنيماتودا بلغ 300000 و 320000 طور معدي IJs لكل مل من النيماتودا *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* على التوالي في حين بلغ 138000 لكل مل في النيماتودا *H. megidis* ، 71470 لكل مل في النيماتودا *S. feltiae* و 450000 لكل مل في النيماتودا *H. indica*

تحليل طرائق الانتاج وأمكانية تحسينها

Analysis of production methods and potential for improvement

تتميز طريقة إنتاج النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs داخل الجسم الحي In vivo في المختبر عنها في طريقة الانتاج خارج الجسم الحي in vitro حيث الكلف المالية لانتاجها تكون قليلة واقل قدر من الخبرات لبدء التشغيل، كما تتميز نوعية النيماتودا المنتجة داخل الحسم الحي مساوية أو افضل نوعا من المنتجة بالطرائق الاخرى فضلا عن تكيف الانواع الجديدة من النيماتودا أو السلالات مع تقنيات الانتاج داخل الجسم الحي بينما طرائق الانتاج خارج الجسم الحي تحتاج الى تعديلات جوهرية في الاوساط الغذائية ومعايير الانتاج. أن التحديات الاساسية في مزارع انتاج النيماتودا داخل الجسم الحي In vivo مقارنة بطرائق الانتاج خارج الجسم الحي In vitro هي فقط كلف الحشرات وبذلك يعد منهج إستعمال الاستزراع داخل الجسم الحي In vivo هو الاقل تكاليف، ومن الممكن تقليل الكلف الاقتصادية لطريقة الانتاج داخل الجسم الحي In vivo وتحسينها بشكل كبير وذلك بتربية الحشرات العائل في المنازل وهذا مايقلل تكاليف الايدي العاملة. هناك العديد من الطرائق لاجراء التلقيح بالنيماتودا وحصادها قد أدخلت في هذا الجانب كما يمكن ان يؤدي تحسين النظم الغذائية للحشرات الى تحسين الكفاءة في انتاج النيماتودا كما ونوعا عبر التفاعلات الثلاثية بين الحشرة العائل والنيماتودا والاوساط الغذائية (via tri-trophic interactions)، كما يمكن جعل عملية انتاج

الحشرات اليا من خلال أتمتتة فصل الحشرات وغربلتها، وعلى الرغم من قلة الانتاج في طريقة الاستزراع داخل الجسم الحي **In vivo** فانه يمكن انتاجها من قبل الشخص نفسه كصناعة منزلية من خلال التطوير التجاري للمؤسسات المختبرية ومن الممكن ان تستمر وربما تتوسع اكثر بناءا على تطور مكننة الانتاج. من حيث الانفاق المالي تعد طريقة اكثار النيماتودا الممرضة للحشرات باستعمال المزارع الصلبة خارج الجسم الحي حالة وسطية في الكلفة بين طريقة الاستزراع داخل الجسم الحي وطريقة الاكثار خارج الجسم الحي باستعمال المزارع السائلة، على غرار الانتاج داخل الجسم الحي يمكن زيادة كفاءة طريقة الانتاج خارج الجسم الحي من خلال اتمتة الانتاج وخفض الايدي العاملة وتحسين الاوساط الغذائية. مؤخرا تطورت اليات انتاج النيماتودا الممرضة للحشرات عن طريق استعمال مفاعلات الحيوية التي تستعمل فيها الاوساط الغذائية السائلة تصل سعتها الى 80000 لتر فضلا من ان الاستزراع بالطريقة السائلة يحتاج كلف مادية اكثر مقارنة بطرائق الانتاج الاخرى وايضا تحتاج استثمارات اكبر و مستوى عالي من الخبرات التقنية. ان الاستزراع المتكرر للنيماتودا سواءا داخل الجسم الحي او خارج الجسم الحي فانه يؤدي الى تقليل الصفات المفيدة للنيماتودا مثل التحمل البيئي والقدرة على التكاثر لذلك يجب اخذ الاحتياطات اللازمة للحد من ذلك مثل إدخال مادة وراثية جديدة، تحسين طرائق الخزن بالتبريد وانشاء سلالات نقية من النيماتودا **Inbred lines**.

تكنولوجيا التطبيق والعوامل التي تؤثر في كفائتها
Application Technology and Factors That Affect Efficacy

التطبيق القياسي **Standard application**: من الممكن أستخدام النيماتودا الممرضة للحشرات **EPNs** مع جميع معدات الرش الارضية سواءا معدات محاصيل الخضر او المعدات البستانية بما فيها المرشات المضغوطة، منفاخ الرذاذ، المرشات الكهروستاتيكية والمرشات الجوية (شكل8، 9، 10، 11). يعتمد إستخدام نوع معدات الرش على نظام المحاصيل المزروعة وفي كل الاحوال هناك عدة إعتبارات متنوعة هي التي تحدد نوعية الالية المستخدمة في التطبيق التي تتضمن: حجم الرش، الخض أو الهز، نوعية فتحة النوزل، الضغط و وقت اعادة التدوير، الظروف البيئية للنظام ونمط توزيع الرش، ومن المهم أثناء التطبيق في المساحات الصغيرة قد تكون المرشات اليدوية او الظهرية هي الاكثر ملائمة بينما عند أستخدام النيماتودا الممرضة للحشرات **EPNs** في المساحات الكبير ينبغي النظر باختيار نوعية الة الرش المناسبة مثل المرشات ذات الذراع المرفوع كما يمكن استخدامها ضمن انظمة الري بالحقن، نظام الري بالحقن تحت السطحي أو التنقيط. يمكن إستخدام توليفات مختلفة من الديدان الخيطية الممرضة للحشرات **EPNs** كمعلق مائي جاهز **Aqueous suspension** يحتوي مواد منشطة مثل الفحم المنشط ، هلام البولي اكرلامايد **Polyacrylamide gels** ، الطين، اسفنج البولي يوريثين **Polyurethane sponge** ، الفيرميكيولات **Vermiculite** والحبيبات القابلة للتشتت بالماء



شكل 8. التطبيق الحقلي للنيماتودا الممرضة للحشرات باستعمال الرشاش اليدوي بالضغط الواطى.



شكل 9.التطبيق الحقلي للنيماتودا الممرضة للحشرات بطريقة فوق سطح التربة باستعمال المرشات اليدوية بدون ضغط.



شكل 10. التطبيق الحقلي للنيماتودا الممرضة للحشرات باستعمال مرشاة الرذاذ بالضغط المسحوبة



شكل 11. التطبيق الحقلي للنيماتودا الممرضة للحشرات باستعمال تقنية الرش بالرذاذ.

العوامل الحيوية التي تؤثر في نجاح التطبيق Biotic factors affecting application success

هناك العديد من العوامل الحاسمة التي تؤثر في نجاح عملية تطبيق النيماتودا الممرضة للحشرات ومن أهمها تطابق وملائمة النيماتودا المستخدمة مع الافة المستهدفة والتي تتظمن: فعالية النيماتودا، أكتشاف العائل، التحمل للظروف البيئية وفي بعض الحالات تواجد أستمرار النيماتودا ومن الاهمية بمكان ولكي تكون النيماتودا فعالة

يجب أن تستعمل النيماتودا بمعدل لايقل عن 2.5×10^{9} طور معدي لكل هكتار (25 لكل سم^{2}) او اكثر وهذا يعتمد على نوع الافة المستهدفة وفي بعض الحالات لربما يتطلب معدلا اكثر او اقل من ذلك، أو يتطلب ذلك النظر في أعادة تدوير النيماتودا مرة أخرى فان كانت الظروف البيئية مؤاتية ستظل النيماتودا باعداد مرتفعة بما يكفي لمكافحة فعالة لمدة 2 – 8 أسبوع بعد التطبيق، لذلك فان أعادة التطبيق الموسمي ضرورية و في بعض الاحيان تستمر المكافحة فعالة لعدة مواسم أو لعدة سنوات. من الممكن أن يكون للعوامل الحيوية تاثيرا إيجابيا أو سلبيا أو محايدا على تطبيقات المكافحة باستخدام النيماتودا الممرضة للحشرات وتشمل هذه المضادات الحيوية: مسببات امراض النيماتودا، مفترسات الديدان الخيطية، البروتوزوا، البكتريا الممرضة للنيماتودا، الفطريات الممرضة للنيماتودا، الحلم المفترس، الديدان الخيطية المفترسة كما توجد هناك علاقة للنيماتودا مع كائنات التربة الاخرى مثل الحلم و ديدان الارض ومتساوية الارجل. لقد تم الكشف عن علاقة تازرية بين النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs مع مسببات الامراض الاخرى مثل البكتريا ***Paenibacillus popilliae*** و ***Bacillus thuringiensis*** والفطر ***Metarhizium anisopliae*** و ***Beauveria bassiana***، ويمكن ان تختلف العلاقة التازرية بين النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs ومسببات الامراض الاخرى إعتمادا على نوع النيماتودا، التوقيت المناسب للتطبيق ومعدل التطبيق.

العوامل غير الحيوية التي تؤثر في نجاح التطبيق Abiotic factors affecting application success

يعتمد التطبيق الناجح للنيماتودا الممرضة للحشرات EPNs على عدة عوامل حرجة تتضمن: الحماية من الاشعة فوق البنفسجية، رطوبة التربة الكافية، الرطوبة النسبية ودرجات الحرارة، في الواقع كانت تطبيقات النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs فوق سطح التربة محدودة للغاية بسبب العوائق البيئية مثل الاشعة فوق البنفسجية والجفاف تلك العوامل تقلل من بقاء وفعالية النيماتودا وبالتالي فان نجاح تطبيق المكافحة الاحيائية باستعمال النيماتودا الممرضة للحشرات يتحقق على الارجح عندما تستعمل النمياتودا في التربة او الاماكن المخفية علما ان الاشعة فوق البنفسجية ضارة بالنيماتودا الممرضة للحشرات لذلك يفضل اجراء تطبيقات المكافحة باستعمال النيماتودا الممرضة للحشرات مساءا او في الصباح الباكر من خلال التطبيق تحت سطح الارض، وفي تطبيقات التربة يلزم ذلك وجود رطوبة كافية تسمح بحركة وبقاء النيماتودا وقد تؤدي زيادة الرطوبة الى حرمان النيماتودا من الاوكسجين وتقيد حركتها لذلك يوصى بالري المنتظم للحفاظ على رطوبة كافية تسهل حركة وبقاء النيماتودا وتختلف مستويات الرطوبة المثلى المناسبة بحسب نوع التربة ونوع النيماتودا كما تختلف درجات الحرارة المثلى المناسبة للعدوى والتكاثر بين انواع وسلالات النيماتودا ايضا. ان بعض الديدان الخيطية الممرضة للحشرات تتحمل الحرارة نسبيا مثل ***H. indica*** ، ***S. glaseri*** و ***S. riobrave*** اما الانواع الاخرى مثل ***H. megidis*** ، ***S. feltiae*** و***Heterorhabditis*** اكثر تحملا للبرودة، كما ان لصفات التربة تاثيرا هاما على تطبيقات النيماتودا التي تجرى في سطح الارض او تحت سطح الارض فلنسجة التربة تاثيرا في حركة النيماتودا وبقائها، عموما عند مقارنة التربة الخفيفة الرملية او المزيجية مع التربة الطينية فأن التربة ذات المحتوى الطيني العالي تقيد حركة النيماتودا وتقلل التهوية مما يؤدي مجتمعا الى خفض نجاح تطبيق النيماتودا وفعاليتها. يمكن ان تؤثر درجة حموظة التربة PH على الانتشار الطبيعي للنيماتودا وان PH التربة 10 او اكثر من المحتمل ان يكون ضارا في تطبيقات النيماتودا بينما درجة الحموظة 4 – 8 من المحتمل ان لاضرر فيها على النيماتودا.

ان نجاح المكافحة الاحيائية باستعمال النيماتودا الممرضة للحشرات كذلك يتاثر في الاسمدة و المبيدات الكيميائية وقد يكون هذا التاثير سلبا او ايجابا او محايدا على النيماتودا الممرضة للحشرات. عموما، الاسمدة التي يتم استخدامها بالمعدلات الموصى بها لها تاثير ضئيل على النيماتودا الممرضة لحشرات **EPNs** كما ان الاسمدة العضوية الطازجة والمعدلات العالية من الاسمدة الكيميائية (مثلا اليوريا 560 كغم / هكتار) تحدد من استمرار تواجد النيماتودا وبقائها. ان بعض المبيدات الكيميائية تكون سامة للنيماتودا الممرضة للحشرات: **abamectin، acephate، aldicarb، dodine، fenamiphos، methomyl، parathion** و **Teflubenuron** في حين ان البعض الاخر يكون متوافقا واحيانا متازرا مع تطبيقات النيماتودا الممرضة للحشرات: **carbaryl، chlorpyrifos، dimethoate، endosulfan، fonofos، tefluthrin** و **imidicloprid** على غرار التداخل مع العوامل الميكروبية الاخرى تختلف العلاقة بين مبيدات الافات الكيميائية والنيماتودا الممرضة للحشرات بناءا على انواع المبيدات الكيميائية المتخصصة وسلالات النيماتودا والجرعات المستعملة وتوقيت التطبيق وبالتالي يجب اختيار التوليفات كل على حده.

تحسين تكنولوجيا تطبيقات النيماتودا الممرضة للحشرات
Improved technology for EPN application

من الممكن تحسين تطبيقات النيماتودا الممرضة للحشرات من خلال تحسين وحدات تجهيز توليفات النيماتودا ففي السنوات الاخيرة حصل تقدم كبير في تطوير هذه التوليفات لاسيما في التطبيقات فوق سطح الارض فعلى سبيل المثال تم خلط النيماتودا مع البوليمرات والمواد الخافظة للشد السطحي كما يمكن تحسين الفعالية من خلال الاعتماد على غمر الاوراق وتغطيتها بمواد تقلل من الشد السطحي بالاضافة الى ذلك تم تحسين تطبيقات النيماتودا ***S. carpocapsae*** في مكافحة حفار اشجار الخوخ الصغير **the lesser peach tree borer, *Synanthedon pictipes*** بشكل كبير من خلال استعمال هلام قابل للرش (مثل الشائع استخدامه لحماية الهياكل من الحريق). وان استعمال النيماتودا ***S. carpocapsae*** كعلاج وقائي ضد سوسة النخيل الحمراء **Red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*** سببت فيها موتا عاليا بلغ 98% وذلك عندما استخدم في في توليفتها مادة الكيتوسان **Chitosan formulation** علاوة على ذلك تم تحسين تطبيقات النيماتودا الممرضة في حشرات سيقان اشجار التفاح **Codling moth, *Cydia pomonella* (L.)** عندما تضمنت المعاملة جل النار القابل للرش **Sprayable fire-gel** او رغوة (فوم) طحين الخشب كعامل حماية للنيماتودا، كما يمكن تعزيز حماية فعالية تطبيقات النيماتودا من خلال تحسين معدات الرش ومنهجية التطبيق فعلى الرغم من الاجراءات الراسخة لدى البعض فيمكن تحسين انظمة معدات الرش مثل : فتحات الرش (النوزلات، المضخات و موزعات الرذاذ) وذلك لضمان بقاء المسبب المرضي و توزيعه. كذلك يمكن تحسين توليفات الطعوم **Bait** للنيماتودا التي تؤدي الى خفض كمية النيماتودا المستعملة في وحدة المساحة وعلى الرغم من محدودية فاعلية الطعوم لكن من الممكن تطويرها بشكر اكبر وهذا يعتبر نهج جديد لجذب الانتباه نحو مومياء الحشرات التي اصابتها النيماتودا الممرضة للحشرات وان عمل معلق من مومياء الحشرات المصابة بالنيماتودا كان له تاثيرا عاليا في توزيع وبقاء النيماتودا وزيادة فاعليتها. لقد ادت الفترة الزمنية الممتدة من 6 الى 10 ايام بين الاصابة والتطبيق في التربة على عثة الشمع الكبرى ***Galleria mellonella*** الى اطلاق اعلى عدد من الاطوار المعدية **IJs** لذلك تمت التوصية باستخدام تطبيقات المومياء المصابة خلال تلك الفترة الزمنية وفي

الاونة الاخيرة تمت التوصيات باستعمال تطبيقات مومياء الحشرات المصابة بالنيماتودا الممرضة للحشرات عن طريق وظعها في اكياس وتوزيعها لاحقا على مواقع الافات المستهدفة، كما يمكن تحسين تطبيقات المكافحة الاحيائية باستعمال النيماتودا الممرضة للحشرات عن طريق تحسين سلالات النيماتودا التي تمتلك صفات جيدة مختلفة مثل تحمل الاجهاد البيئي، شدة التاثير وزيادة النسل الناتج عن الجيل، وذلك عن طريق الانتخاب، التهجين والتلاعب الجزيئي ويعد حاليا الاكتشاف للسلالات والانواع الجديدة التي تتفوق عن نظيراتها التي يتم تسويقها نهجا مباشرا يمكن ان يعزز بسرعة نجاح فعالية تطبيقات النيماتودا الممرضة للحشرات وهذا الاكتشاف بدء بالتزايد بشكل كبير. لقد ادى التقدم الكبيرفي تكنولوجيا الانتاج والتطبيق الى التوسع في استخدام النيماتودا الممرضة للحشرات ووجود اسواق متخصصة وبات الانتاج المختبري داخل الجسم الحي **In vivo** هي الطريقة المناسبة التي تتطب تكاليف مالية قليلة واقل قدر من الخبرة الفنية لبدء التشغيل ولكن يعتبر توفير غذاء الحشرات العائل وتكاليف الايدي العاملة هو العائق امام ذلك، اما عندما يتعلق الامر بالجانب التجاري للاسواق الدولية فيعتبر الاستزراع السائل للنيماتودا في المختبر من اكثر العمليات فعالية من حيث الانتاج والتكلفة، اما الاستزراع على المزارع الصلبة فيعتبر حالة وسطية بين الاثنين وكلاهما يحتاج كلفا مادية وايدي عاملة كما ان زيادة الانتاج له دور كبير في برامج الادارة المتكاملة للافات.

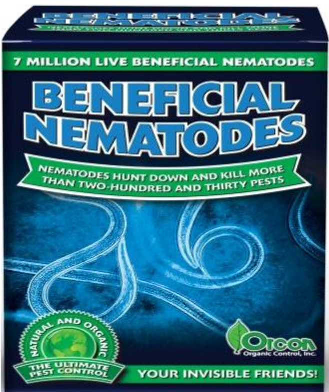
الانتاج الكمي والخزن للنيماتودا الممرضة للحشرات

يتم إكثار النيماتودا الممرضة للحشرات على وسط غذائي أصطناعي وخزنها تحت ظروف المختبر، أثنان من المصادر الغذائية المستخدمة في الوسط الغذائي والممزوج بماء المقطر مرتين DD و تعديل PH إلى 7.3 - 7.5 وهذه العملية رخيصة جدًا، ومن ذلك فإن 150 طور معدي IJs أعطت 33000 طور معدي IJs في فترة أسبوع واحد وتحملت الخزن لأكثر من أربعة أشهر مع نشاط عالي وقدرة إمراضية عندما تم تربية النيماتودا على الوسط الغذائي الاصطناعي.

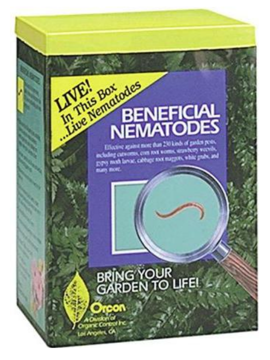
اجرى العسس واخرون (2018) تخزين عزلة محلية من النيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabditis bacteriophora* عدة مستنبتات تشمل :مطحون الخفان، التربة، البيتموس، التورب، رمل مزار والبرلايت. كما أضيفت مادة البكتين، الغار، السيليكاجيل وكاربوكسي ميثايل سليولوز كمواد محسنة لوسط التخزين. وقد اختبر كل وسط من الاوساط المذكورة بمفرده، بالضافة إلى اختباره مضاف إليه المواد المحسنة. أخذت نتائج النسب المئوية لبقاء أفراد النيماتودا على قيد الحياة في نهاية كل أسبوع لمدة ثمانية أسابيع. بلغ متوسط نسبة بقاء أفراد النيماتودا في نهاية فترة التخزين 67.33 % على وسطي الخفان + رمل المزار، و67.32 %على وسط الخفان + آلغار، و33.32 %على وسط الخفان + السيليكاجيل، وتعد هذه النسب هي أعلى النسب لبقاء الافراد على قيد الحياة.

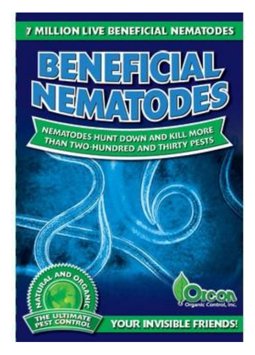
تجاريا تجهز النيماتودا بشكل عبوات تحتوي 5 الى 500 مليون طور معدي وتوزع بشكل مبرد وتخزن تحت درجة حرارة 4 س^{0} في حالة عدم الاستعمال المباشر ويمكن ان تحتفظ بحيويتها لمدة شهر تحت هذه الدرجة. يمكن ان تحمل على المواد الاتية: **Clay, vermiculite, alginate gels, diatomaceous earth** (شكل 12)

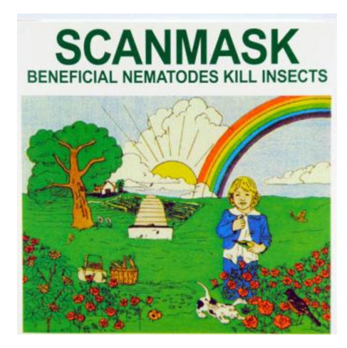
















شكل 12. صور لبعض المنتجات التجارية للنيماتودا الممرضة للحشرات EPNs.

تأثير أشعة كاما على النيماتودا الممرضة للحشرات

عند تعريض النيماتودا الممرضة للحشرات على جرعة 2 غري من أشعة كاما أدى إلى الأسراع في قتل الحشرات مقارنة بالنيماتودا غير المشععة وقد يعزى سبب ذلك إلى زيادة القابلية الإمراضية للبكتريا التكافلية المتعايشة مع النيماتودا لأنتاج السموم البكتيرية.

مميزات النيماتودا الممرضة للحشرات

تتمتع النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs بمزايا معينة مقارنة بالمواد الكيميائية، كعوامل مكافحة أحيائية:

- ❖ مستدامة
- ❖ متلائمة في التربة والأنسجة النباتية.

- ❖ النيماتودا الممرضة للحشرات غير ملوثة وبالتالي فهي آمنة بيئياً.
- ❖ درجة عالية من الأمان للنباتات والماشية والبشر.
- ❖ يمكن خزنها لعدة أشهر عند 8 درجة سيليزية إذا لم يتم أستخدامها على الفور.
- ❖ يمكن أستعمال الأطوار المعدية بالمعدات التقليدية للمكافحة.
- ❖ متوافقة مع جميع معدات المكافحة.
- ❖ متوافقة مع معظم المبيدات الحشرية.
- ❖ غير مكلفة عند الأنتاج الواسع.
- ❖ يمكن تطبيقها على المواد الصلبة (التربة، الكمبوست، وغيرها) أو هوائيا (على المجموع الخضري والسيقان).
- ❖ ممكن أن تبحث بنشاط عن الآفة المستهدفة، وفقا للنوع، على سبيل المثال ***Steinernema. carpocapsae*** تستخدم استراتيجية "المباغتة" **ambush** ، فتنتظر العائل المستهدف بالقرب من سطح التربة، بينما تتبع ***Heterorhabditis bacteriophora.*** استراتيجية "الطوافة" **cruiser** بحثا عن هدفها.
- ❖ النيماتودا الممرضة للحشرات من نوع ***S. feltiae*** تهاجم الحشرات من رتب غمدية الأجنحة **Coleoptera**، بينما على النقيض فإن ***H. bacteriophora*** تهاجم فقط حشرات حرشفية الاجنحة **Lepidoptera**و غشائيات الأجنحة**Hymenoptera** .
- ❖ النيماتودا الممرضة للحشرات تقتل الحشرة المضيفة بفعل الانزيمات التي تفرزها البكتيريا التكافلية وتتغذى النيماتودا على نواتج الهظم.
- ❖ النيماتودا الممرضة للحشرات لا تنتمي للنيماتودا الممرضة للنبات ولا تستخدم المواد النباتية كمصدر للغذاء.
- ❖ لا تترك أي متبقيات في المحصول.
- ❖ ممكن استخدامها بجانب عوامل المكافحة الحيوية الأخرى أو مكونات نظم المكافحة المتكاملة للآفات.
- ❖ ممكن استخدامها في الزراعة العضوية.
- ❖ متوافقة مع اغلب عناصر المكافحة الاحيائية الاخرى.

يتمكن المنتجون بتعبئة النيماتودا على مجموعة متنوعة من الوسائط الصلبة (الطين، الفيرميكيولايت، المواد الهلامية المهتزة، التراب الدياتومي والوسائط الاصطناعية).

بعض التطبيقات الحقلية للنيماتودا الممرضة للحشرات

التحضيرات للتطبيق:

يجب تحضير النيماتودا الممرضة للحشرات للتطبيق الحقلي في موعد لايتجاوز ساعة واحدة. إذا كانت النيماتودا في معلق سائل يجب رج الحاوية جيدًا وصب السائل في حاوية التطبيق (الخزان أو المرشة الظهرية أو علبة الري او حاوية الشحن مرتين مع الماء البارد (حوالي 16 درجة سيليزية) وسكب ماء الشطف في

حاوية التطبيق. أما إذا كانت النيماتودا على إسفنجة فيجب نقع الإسفنجة في 4 لتر من الماء البارد لمدة 10 دقائق ثم صب الماء في وعاء التطبيق و شطف الإسفنجة عدة مرات بعد كل شطف، إذا كانت النيماتودا في الفيرميكيولايت فيضاف خليط الفيرميكيولايت والنيماتودا مباشرة إلى الماء في وعاء التطبيق وتحريكه حتى يتفتت وينتشر وبمجرد خلط الديدان الخيطية بالماء فيجب تحريك الخليط كل خمس دقائق للحفاظ على الديدان الخيطية في حالة تعليق وتزويدها بالأكسجين.

معدات التطبيق:

يعتبر أستخدام النيماتودا الممرضة للحشرات المحملة بالفيرميكيولايت كأفضل منتج حبيبي. يمكن تطبيق تركيبات أخرى بأستخدام معدات مبيدات الآفات السائلة القياسية ومعدات الأسمدة ومعدات الري بضغط يصل إلى 300 رطل لكل بوصة مربعة، كما يمكن أستخدام المرشات الكهروستاتيكية ذات المروحة والمضغوطة والرذاذ ويجب مراعاة بعض الجوانب عند تطبيق أعمال رش المعاملة بالنيماتودا بغية الحصول على أفضل النتائج:

- ❖ تحريك الخزانات بأستمرار من خلال الرش المفرط (إعادة تدوير خليط الرش).
- ❖ أرتفاع درجة الحرارة في الخزان أكثر من 30 درجة سيليزية يؤدي الى تلف النيماتودا.
- ❖ إزالة جميع المصافي أو الفلاتر أو قطع الشاش ألتي تقل فتحاتها عن 50 mesh الموجودة في معدات الرش أو معدات الري وذلك لغرض السماح للنيماتودا بالمرور عبر هذه الفتحات.
- ❖ فحص فتحات فوهة الرش للتأكد من عدم إنسدادها أثناء التطبيق وخاصة فوهات الرش المباشر في التربة لزيادة أعداد النيماتودا ألتي يتم تطبيقها مباشرة على التربة.
- ❖ حجم الرش الكبير مثالي و يوصى بأستخدام كميات من 8 – 24 لتر من الماء لكل 1000 قدم مربع (350 – 1000 لتر لكل فدان) بحسب الموصى به في معظم ملصقات النيماتودا.

معدلات التطبيق:

قبل تطبيق أي عامل مكافحة أحيائي بما في ذلك النيماتودا الممرضة للحشرات يجب قراءة ملصق المنتج للحصول على تعليمات أستخدام محددة. عموما يوصى بمعدل تطبيق يبلغ مليار نيماتودا لكل نصف هكتار للسيطرة على معظم حشرات التربة، أما للمساحات الأصغر فيوصى بمعدل أستخدام 250000 نيماتودا لكل متر مربع، بمعدل يصل إلى 200 مليون نيماتودا لكل نصف هكتار مطبق في نطاق يوفر تحكماً فعالاً في خنافس الجذور في بساتين الحمضيات. لقد أستخدمت النيماتودا الممرضة للحفارات ضمن برنامج للمكافحة المتكاملة لحفارات النخيل ألتي تتبع الجنس *Oryctes* كوسيلة لمكافحة مرحلة اليرقات تزامناً مع تواجدها بأعمارها اليرقية الأخيرة وذلك خلال شهر تشرين ثاني November حيث درجات الحرارة تتراوح مابين 20 – 30 درجة سيليزية تحت ظروف المنطقة الوسطى من العراق وطبق البرنامج بشكل ريادي في بساتين مساحتها 2 هكتار، علما من الصعوبة أستعمال عوامل المكافحة الاحيائية كالنيماتودا والفطريات الممرضة للحشرات لمكافحة مرحلة البالغات وذلك لتزامن وجودها ونشاطها خلال الاشهر الحارة (حزيران، تموز وآب) والتي

تصل فيها درجات الحرارة مابين 40 – 50 سيليزية فضلاً عن إنخفاض فاعلية النيماتودا على بالغات الحفارات.

السلامة والأمان:

تعتبرالنيماتودا الممرضة للحشرات مثل جميع كائنات المكافحة الأحيائية كما تعتبر مبيدات أفات حشرية. لذلك فإن هذه النيماتودا آمنة على البيئة وصحة الإنسان سواءاً الحيوانات الأليفة أو الحيوانات البرية أو النباتات كما إنها لا تضر الحشرات النافعة مثل نحل العسل.

بعض التطبيقات الحقلية للنيماتودا الممرضة للحشرات في مكافحة بعض الافات الحشرية

تعد الديدان الخيطية الممرضة للحشرات EPNs او مسببات الامراض الميكروبية لمجاميع الافات الحشرية احد عناصر المكافحة الاحيائية للحشرات التي هي احد عناصر برامج المكافحة المتكاملة للافات، وقد استخدم في هذا المجال عدة انواع من النيماتودا ضمن التطبيقات الحقلية لكبح سكان العديد من الافات الحشرية.

حشرة False codling moth, Orange moth (*Thaumatotibia leucotreta*) (Meyrick)

تعد حشرة False codling moth, Orange moth (*Thaumatotibia leucotreta*) (Meyrick) من اهم افات اشجار الفاكهة في جنوب افريقيا والمناطق شبه الاستوائية، واجريت العديد من التقنيات لكبح سكان هذه الافة ونفذت تجارب شبه حقلية في بساتين الاوفكادو وبعض بساتين الفاكهة الاخرى باستخدام اربع انواع من النيماتودا الممرضة للحشرات EPNs وحصل موت مباشر في الحشرة بعد يومين من تطبيق اعمال المكافحة واستمر تواجد النيماتودا ل 7، 14، 21، 28، 35 و 42 يوم بعد التطبيق. اشارت نتائج التجارب الحقلية أن استعمال 30 طور معدي IJs/ 30 سم^2 من النيماتودا *Steinernema yirgalemense* سبب اعلى نسبة قتل في الحشرة بلغ 86% بعد التطبيق مباشرة مقارنة باقل نسبة قتل (63%) سببتها النيماتودا *Steinernema litchii*. ووجد اعلى بقاء للنيماتودا حتى 14 يوم بعد المكافحة ثم انخفض تدريجيا حتى اليوم 28.

دودة جذور الذرة الصفراء (Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera*)

استخدم معلق للنيماتودا الممرضة للحشرات كعامل مكافحة احيائية ضد واحدة او اكثر من افات الذرة الصفراء (دودة جذور الذرة الصفراء Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera*). المعلق عبارة عن مستحضر تجاري من الانتاج الواسع للنيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabditis* ونفذت اعمال المكافحة بالتزامن مع فقس بيض الحشرة في التربة واشارت النتائج الى فعالية عالية للنيماتودا في كبح سكان هذه الافة

خنفساء اوراق الحبوب ..*Oulema melanopus* L

تعد خنفساء اوراق الحبوب *Oulema melanopus* L من اخطر الافات التي تسبب ضررا للنبات وانتاج الحاصل كما ونوعا وفي الاصابات العالية ينخفض جزء النبات الموجود فوق سطح الارض الى 50% ويصل احيانا الى 80% مما يسبب خسارة في الحاصل تتراوح بين 10 – 25%. استخدمت النيماتودا الممرضة للحشرات *Steinernema feltiae* و *H. bacteriophora* في مكافحة يرقات هذه الافة واستخدم لهذا الغرض معلق النيماتودا بجرعة 2 مليون طور معدي IJs لكل سم^2 وبمعدل 11 لتر لكل متر مربع وتمت المعاملة باستخدام مرشات يدوية تحتوي رجاج ومزودة بفتحات رش (نوزل) ذات تيار مسطح وبمعدل ضغط 3000 بار/ ساعة. سببت النيماتودا *S. feltiae* فاعلية متوسطة بلغت 47.8% اما النيماتودا *H. bacteriophora* فاعطت فاعلية 49.5% كما سببت خفض عالي في الضرر الذي تسببه الحشرة في الاوراق.

أشجار الحمضيات والاعشاب

وجد عبد النبي واخرون (2017) ان نسبة وجود النيماتودا الممرضة للحشرات في حدائق وبساتين دمشق 8.4%، ووجود الجنسين *Steinernema* و*Heterorhabditis*، تبين أن أكبر نسبة لانتشار النيماتودا الممرضة للحشرات في الحمضيات 1.11% يليها الأعشاب 9.37%، ثم المروج 9.18.% ، ووجدوا علاقة معنوية بين انتشار النيماتودا وأنواع الترب، حيث وجدت النيماتودا بنسبة مئوية أكبر في الترب ذات القوام الرملي اللومي والقوام الرملي الطيني اللومي، كما وجدت علاقة معنوية بين انتشار النيماتودا وطرق الري حيث تفوقت طريقتا الري بالرذاذ والري بالتنقيط على طريقة الري السطحي في تأثيرها على انتشار النيماتودا، كما وجدت علاقة معنوية بين انتشار النيماتودا ووجود الحشرات فكانت أكبر نسبة مئوية لانتشار النيماتودا في الترب المصابة بالديدان البيضاء والدودة القارضة. كما وجدSteinernema أن الجنس *Steinernema* ينتشر بدرجات الحرارة المعتدلة إلى الباردة، في حين وجد الجنس *Heterorhabditis* عند درجات الحرارة المعتدلة إلى المرتفعة.

الدودة البيضاء والديدان السلكية

استخدم بشير واخرون (2018) أربعة أنواع من النيماتودا الممرضة للحشرات هي *Steinernema* : *feltiae* Filipjev،*S. carpocapsae* (Weiser)، *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar و *H. zealandica* Poinar وبثلاثة تراكيز 500 – 1000 – 2000 طور معدي /1مل ماء، لإختبار فاعليتها ضمن الظروف المخبرية ضد يرقات الديدان البيضاء *Anomala orientalis* Waterh والديدان السلكية (Linnaeus) *Agriotes lineatus* والديدان القارضة .(Hufnagel) *Agrotis ipsilon* فتبين تفوق النوع *H. zealandica* معنوياً على بقية الأنواع المستخدمة في مكافحة يرقات الدودة البيضاء والديدان السلكية حيث حقق نسبة موت 100%، يليه النوع *H. bacteriophora* حيث وصلت نسبة الموت إلى 86.67 %، كما تفوق النوعان*H. zealandica* ، *S. feltiae* معنوياً على بقية الأنواع في مكافحة الديدان القارضة مختبرياً حيث بلغت نسبة الموت 100% بعد أربعة أيام من المكافحة. بلغت نسبة مكافحة اليرقات

التابعة لفصيلة Scarabaidae حقليًا 40-55.6% عند استخدام النوع*H. bacteriophora* ، بينما إرتفعت هذه النسبة عند النوع *H. zealandica* إلى 53.3-77.8% وذلك بعد 14 يوم من التطبيق، كما تبين تفوق النوع *H. zealandica* معنوياً على النوع *H. bacteriophora* عند التركيزين 1000-2000 طور معدي/مل وكان أكثر كفاءة في المكافحة.

الديدان القارضة

استخدمت النيماتودا الممرضة للحشرات في المحاصيل الحقلية لمكافحة اليرقات الحشرية لديدان التربة القارضة كالأنواع التابعة للجنس(*Agrotis spp.* ، وفي محاصيل البيوت البلاستيكية المحمية لمكافحة يرقات بعوض الفطر fungus gnats كالأنواع التابعة للجنس*Bradysia spp.*، وفي بساتين الفاكهة لمكافحة عث الثمار codling moth مثل (*Cydia pomonella*)..

جعل العنب

من الأمثلة الناجحة لاستخدام النيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabditis bacteriophora*في المملكة المتحدة هو مكافحة جعل العنب (*Otiorynchus sulcatus*) Vine weevil

حفار الطماطة

اختبر درويش واخرون (2020) فعالية ثلاث عزلات من النيماتودا الممرضة للحشارت اثنان منها تتبع *Heterorhabditis bacteriophora* و واحدة تتبع *Steinernema carpocapsae* حقليا ومخبريا ضد يرقات وعذارى حفار الطماطة *Tuta absoluta* استعملت جرعة 50 طور معدي/ سم^2، اختلفت حساسية اليرقات بإختلاف العزلة المختبرة، اعطت عزلات النيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora* نسبة قتل بلغت 80.75% أما *Steinernema carpocapsae* اعطت 68.88% تحت الظروف الحقلية. اما مختبريا فقط اعطت الينماتودا *Steinernema carpocapsae* نسبة قتل 90% مقارنو ب 86% للنيماتودا *Heterorhabditis bacteriophora*

حفار النخيل ذو القرون الطويلة

عزل الجبوري وصالح (2001) نيماتودا متطفلة على حفار ساق النخيل ذو القرون الطويلة وحفار عذق النخيل .ربيت هذه الديدان مختبريا على حشرات تعود الى غمدية الاجنحة اثبتت هذه النيماتودا فاعلية على جميع الحشرات المختبرة اذ بلغت نسبة القتل 100 % بعد 1 - 3 ايام لحرشفية الاجنحة و 2- 6 ايام لغمدية الاجنحة بأستثناء حفار ساق الرمان الذي لم يتاثر بها شخصت هذه النيماتودا بانها تتبع الجنس *Steinernema*. عند اختبار هذه الديدان حقنا بالنخيل تمكنت من البقاء وحققت نسبة قتل عالية في يرقات الحفار بعد ثلاثة اشهر من المعاملة

حفارات النخيل التي تتبع الجنس Oryctes

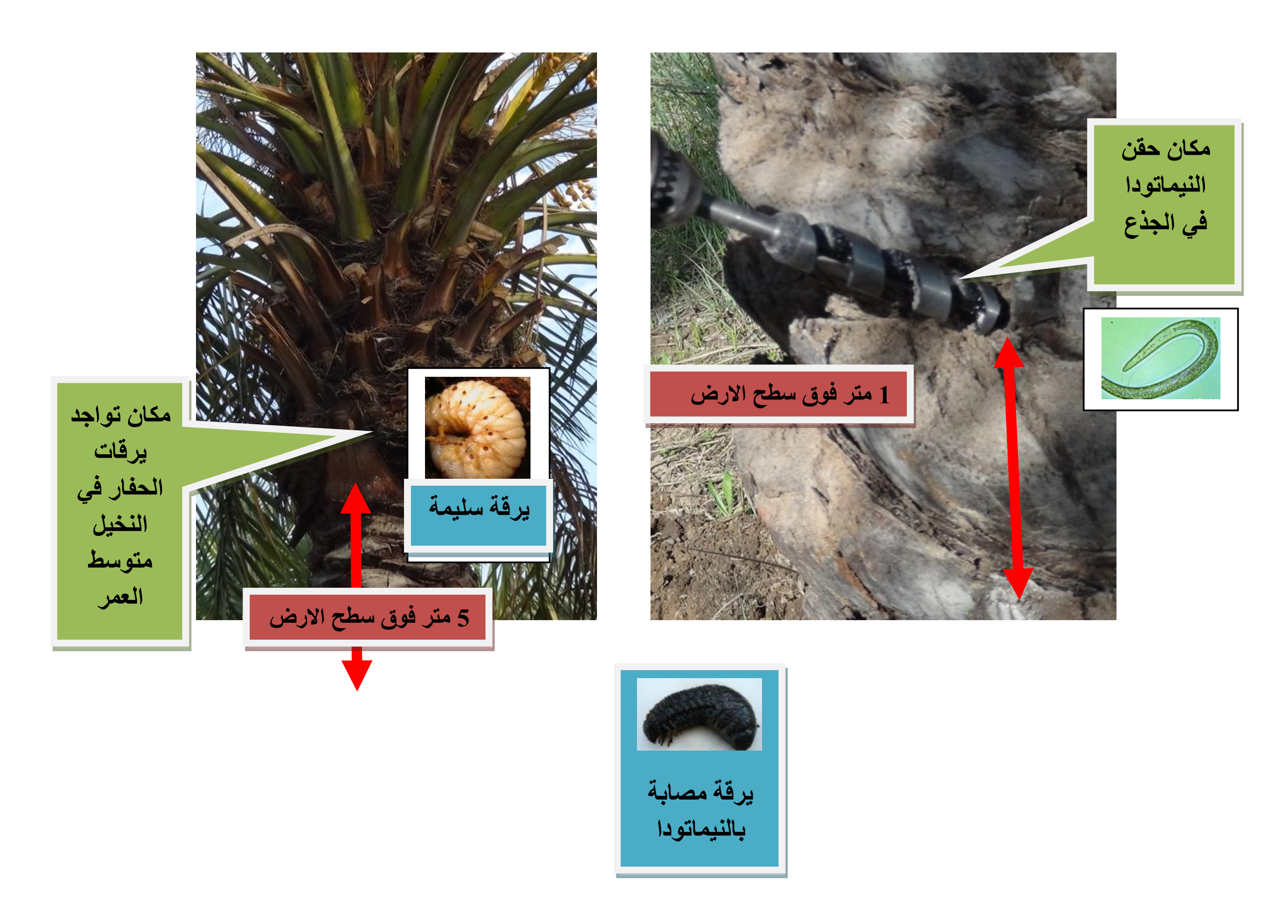
درست فاعلية النيماتودا *Metarhabditis blumi* و*Metarhabditis adenobia* مختبريا وحقليا في أثنين من بساتين نخيل التمر في العراق كعامل مكافحة أحيائية للسيطرة على أحد أنواع حفارات النخيل خنفساء وحيدة القرن العربية (*Oryctes agamemnon arabicus*) ألتي تتبع الجنس *Oryctes*. مختبريا أستعملت أربع تراكيز من النيماتودا 0، 600، 1200، 1800 طور معدي IJs في كل مل وتمت معاملة اليرقات والحشرات البالغة بطريقتين أحدهما بالرش المباشر على اليرقات والثانية بمعاملة الوسط الغذائي الطبيعي لليرقات (قطع كرب طري). أما حقلياً نفذ البرنامج في بستانين للنخيل صنف بريم (الصنف الأكثر تفضيلاً للحفارات)، الأول بدون معاملة بالنيماتودا، بينما تمت معالجة البستان الثاني بأستخدام النيماتودا وأستعمل 50 مل محلول معلق فيه النيماتودا بتركيز 1800 طور معدي IJs لكل مل عن طريق الحقن في الجذع في 10 أشجار (الشكل 11). مختبريا حسبت أعداد اليرقات والبالغات الميتة يوميا خلال 5 أيام، أعطت النيماتودا نسبة قتل 92% و 62% في اليرقات عند أستعمالها بطريقة الرش المباشر و معاملة الغذاء على التوالي عند أستعمالها بالتركيز 1800 طور معدي/ مل، أما على البالغات فكانت الفاعلية 26%. أما عند أستعمال النيماتودا حقليا من خلال حساب اليرقات في عشرة أشجار في كل بستان قبل المعالجة خلال السنة الأولى والثانية بعد المعاملة، فقد أوضحت النتائج الحقلية أن هناك فاعلية مقبولة لتطبيق النيماتودا كعامل مكافحة أحيائية ضمن النظام البيئي لبساتين النخيل حيث أنخفظت الكثافة السكانية لليرقات بنسبة 45% ويشير ذلك إلى قابليتها للتحرك من خلال الحزم الوعائية لجذع النخلة كون قطر الحزم الوعائية للنخلة أكبر من قطر جسم النيماتودا (جدول 2).

قابلية البكتريا على اصابة الحشرات والانسان

Photorhabdus bacteria with ability to infect both insects and humans

الصفة المميزة لبعض بكتيريا *Photorhabdus* هي الإمراضية للإنسان وان أكثر من اثنتي عشرة حالة التهابات في الانسجة الرخوة تسببت فيها البكتريا *Photorhabdus* وحالات تجرثم في الدم قد تم توثيقها لحد الان ولكن لربما يكون ذلك خطأ في التشخيص، وان اول حالة مرضية في الجنس البشري عزلت منها البكتريا *Photorhabdus* هي لمريض مصاب بقرحة الساق في الولايات المتحدة الامريكية خلال 1989 ثم تبع ذلك عزل عينات من هذه البكتريا في حالات في الانسان في امريكا واستراليا في 2003 ومنذ ذلك الوقت كان يعتقد في البداية ان هذه البكتريا غير قادرة على التعايش مع الديدان الخيطية ولكن ظهرت لاحقا انواع جديدة لها صفة التعايش مع الديدان الخيطية ومنها *P. asymbiotica*. ومع ذلك في 2006 ظهرت سلالات من البكتريا *Photorhabdus* لها صفة التعايش مع النيماتودا *Heterorhabditid* ووصفت وصنفت ب *Heterorhabditis gerrardi*. وذلك فمن المقبول الان ان البكتريا *Photorhabdus* الممرضة للانسان هي

قادرة على تشكيل علاقات تبادلية تعايشية مع النيماتودا **Heterorhabditis** والتي تصيب الحشرات بكفاءة عالية ويوجد الان نوعين من هذه البكتريا هما ***P. asymbiotica*** و ***P. australis*** وكلاهما سلالات مشتقة من البكتريا ***Photorhabdus*** من مواقع مختلفة. ولمعالجة اسلوب أمراضية هذه البكتريا الخاصة بالانسان تم معالجة ذلك ودراسة تنوعها وتطورها بشكل مكثف من خلال تنفيذ الجينوم الكامل التسلسل والتحليل الترانسكريبتومك **implementing whole genome sequencing and transcriptomic analysis**، وقد وجد ان البكتريا ***P. asymbiotica*** و ***P. australis*** تمتلك جينوم صغير مقارنة بالبكتريا ***P. luminesces*** وبذلك تنتج سموما ضد الحشرات تكون اقل تنوعا فضلا عن العديد من البلازميدات والجزر السمية في الجينوم. لقد اثبتت الادلة الحالية ان العلاقات المتبادلة لهذه البكتريا من النيماتودا الى الانسان تم تسهيل الكشف عنها بسهولة بواسط حدة الجينات **virulence genes** (ضرورية لاحداث العدوى في الحشرات العائل) والموجوده عادة في جينوم البكتريا بالاضافة الى تاثير العوامل الاخرى (المناسبة لعدوى الخلايا الثديية) الحاصلة من الانتقال الافقي من مسببت الامراض البشرية الاخرى، على عكس الانواع الاخرى ***Photorhabdus*** مثل ***P. asymbiotica*** و ***P. australis*** التي يمكن ان تنمو على درجة حرارة 37 سيليزية التي تخضع للتحول الايضي والتطبع لايض الثدييات العائل. على الرغم من الجهود الكبيرة التي بذلت حول الية انتقال البكتريا ***Photorhabdus*** الى جسم الانسان لكنها لاتزال غير واضحة. والسيناريو الاكثر احتمالا هو ان الديدان الخيطية التي تحمل البكتريا قد تخترق جلد الانسان وبالتالي تنقل التعايش المايكروبي الى الانسان وتسبب الالتهابات.



شكل11 . ألية حقن النيماتودا وتحركها في جذع النخلة.

جدول 2. قياسات قطر الحزم الوعائية لنخيل التمر ومواصفات الجسم للنيماتودا الممرضة للحشرات.

1 - قطر الحزم الوعائية لنخيل التمر (حزم وعائية جافة): 1080 -1180 مايكرومتر (الصنف برحي/ العراق) (ملمتر mm = 1000 مايكرومترµm ، ملمتر mm = 1000000 نانومتر nm)

2 - أبعاد جسم بعض أنواع النيماتودا الممرضة للحشرات (مايكرومتر):

طول الذيل Tail	طول المرئ Esophagus	من النهاية الداخلية حتى فتحة المخرج	العرض	الطول
42 - 35	106 - 94	38 - 30	21 - 18	489 - 446
101 - 98	115 - 104	97 - 90	20 - 19	528 - 512
28 - 24	101 - 96	123 - 110	42 - 39	721 - 582
27 - 24	138 - 134	59 - 55	128 - 107	1141- 1035

عزل واكثار النيماتودا الممرضة لحشرات باستخدام طريقة مصايد دودة الشمع *Galleria*

Isolation and Propagation of nematodes (Galleria Trap Method):

الخطوة 1:

عمل طعم من الحشرات، دودة الشمع (Galleria trap)، 250 غم تربة توضع في صندوق بلاستك وتزود بطعم (5 يرقات دودة الشمع *Galleria mellonella*، يخزن الصندوق لمدة 5 أيام تحت درجة حرارة 25 ^{0}س.

الخطوة 2:

تجمع اليرقات الميته وتنقل على مصايد بيضاء White trap، تجمع الاطوار المعدية IJs تعاد الخطوة ثلاث مرات لجمع اكبر عدد من النيماتودا.

الخطوة الثالثة:

اختبار امراضية الاطوار المعدية IJs ضد دودة الشمع *Galleria larvae*.

الخطوة الرابعة:

تكاثر النيماتودا عن طريق الاطوار المعدية وذلك بوضعها في اطباق بتري قطر 4.5 سم موضوع في قاعدها ورق ترشيح Whatman No.5 ثم يوضع في الطبق 5 يرقات دودة الشمع وتحضن الاطباق في درجة حرارة المختبر حتى خروج الاطوار المعدية من مومياء اليرقات cadavers على ورق الترشيح.

الخطوة الخامسة:

تخزن الاطوار المعدية IJs لمدة 3 اسابيع تحت درجة حرارة 15 ^{0} س وبتركيز 1000 طور معدي لكل مل من الماء المقطر مضافا اليه 0.1% فورمالين في فلاسك زراعة انسجة ثم تخزن تحت درجة 19 ^{0} س في حاظنة B.O.D. لاحقا تستعمل النيماتودا للاعمال الروتينية على يرقات دودة الشمع.

هذه الخطوات بحسب

1-Beeding and Akhurst (1975)

2- White (1972)

3- Pelezer and Reid (1972)

4- Woodring Kaya (1988)

طريقة تحضير الشرائح (السلايدات) الدائمية للنيماتودا الممرضة للحشرات

" تقنية السلايد الدائم في الدراسات التصنيفية والخلوية والتشريحية للنيماتودا"

بحسب طريقة Ryss (2003)

لاعداد شرائح دائمية للنيماتودا (الديدان الخيطية) كي تستخدم لاغراض مختلفة : الدراسات الجزيئية، البيئية والفيزيابيئية، كما يمكن ان تعتمد لتصحيح التغيرات التصنيفية بعد عدة سنوات. كما تعتمد الشرائح الثابتة للنيماتودا في التصنيفات الموثوقة لعينات النيماتودا. الاساليب التقليدية لعمل السلايدات تم تطويرها باستخدام الحرارة والكلسرول.

الخلاصة:

1 - انبوبتين ابندورف (0.5 مل) احدهما تحتوي نيماتودا حية (تنقل بالنيدل) يضاف لها قطرة صغيرة من الماء ، اما الثاني مملوء بالفورمالين 4% ويوضع في بيكر على درجة حرارة 95 س.

2 - ينقل الفورمالين 4% (95 م) من الانبوب الثاني الى الى الانبوب الاول الذي يحتوي نيماتودا بواسطة بايبيت بلاستيكي.

3 - 20 – 40 دقيقة لتثبت النيماتودا الموجودة في انبوب ابندورف داخل البيكر الذي يحتوي ماء على درجة حرارة 80 م

4 - يشطف الانبوب الاول (الذي يحتوي النيماتودا) بالماء المقطر وتقطر النيماتودا في حاوية السلايد المقعر (يحتاج بعض الوقت لنقل جميع النيماتودا الى التقعر).

5 - تنقل النيماتودا الى السلايد الزجاجي الموضوع فيه مزيج من الماء و الكلسرين بنسبة 20:1

6 - يوضع السلايد على صفيحة حارة عند درجة 70 س لمدة 15 – 20 دقيقة.

7 - يتبخر الماء من المزيج الموجود على السلايد بعدها تبقى النيماتودا مع الكلسرين اللامائي.

8 - تضاف قطرة من الكلسرين الى التقعر الذي يحتوي النيماتودا

9 - تنقل النيماتودا الى قطرات صغيرة من الكلسرين النقي الموجودة على السلايد الزجاجي

10 -يوضع غطاء السلايد بزاوية فوق مزيج الكلسرين والنيماتودا الموجودة على السلايد الزجاجي مع مراعاة اضافة قطعتين من البارافين الى جانبي غطاء السلايد (من الجانبين).

11 -يوضع السلايد على صفيحة حارة عند درجة حرارة 80 – 85 س حتى ذوبان البارافين ويختم قطرة الكلسرين والنيماتودا

12 -النتيجة النهائية : الحصول على سلايد النيماتودا مع قطرة الكلسرين المحاط بالبارافين.

وبحسب الخطوات الاتية:

أولا: القتل Killing

تعتمد الحرارة العالية في القتل والتثبيت. وتستعمل الاوعية البلاستيكية فقط (انابيب، وماصات ابندورف) في البدء ثم بعدها تستخدم الزجاجية ولاتستعمل الزجاجية فقط. وتستعمل الادوات الزجاجية وذلك لتوصيلها الجيد للحرارة مقارنة بالبلاستيكية كما ان السوائل تبرد فيها بشكل اسرع. يستعمل للقتل انبوبين ابندورف، الاول توضع فيه النيماتودا الحية مع قطرة صغيرة من الماء، والثاني يوضع فيه فورمالين 4% ونكمل الحجم في الانبوب للاعلى. تستعمل هذه التقنية مع النيماتودا النشطة الحركة.

يوضع في الانبوب الاول 10 ميكرولتر ماء مقطر ثم تنقل اليه النيماتودا بواسطة النيدل، هذا الانبوب الذي يحتوي النيماتودا الحية لربما يحفظ في الثلاجة لعدة ايام وعند درجة حرارة 4 – 8 س^0 قبل اجراء عملية التثبيت، اما انبوب ابندورف الثاني فيوضع فيه فورمالين 4% ويوضع داخل بيكر فيه ماء ويوضع البيكر مع الانبوب على هيتر صفائحي عند درجة حرارة 95 س^0 او تستعمل ماكنة PCR وعند نفس درجة الحرارة.

ينقل الانبوب الاول الذي يحتوي النيماتودا من الثلاجة ويوضع في المختبر حتى وصوله لنفس درجة حرارة الغرفة، يصب الفورمالين الساخن الموجود في الانبوب الثاني بسرعة في الانبوب الاول الذي يحتوي النيماتودا الحية وتستعمل الماصة (بايبيت) البلاستيكية لهذا الغرض. يغلق الانبوب الذي يحتوي النيماتودا ويهز بشكل جيد وذلك لتجنب التصاق النيماتودا بجدران الانبوب.

ثانيا: التثبيت Fixation

يخضع الانبوب الذي يحتوي النيماتودا مع الفورمالين الى برنامج حراري مسيطر عليه:

- 95 س^0 لمدة 2 دقيقة.
- 65 س^0 لمدة 10 دقائق.
- 75 س^0 لمدة 10 دقائق .
- 85 س^0 لمدة 10 دقائق.
- 95 س^0 لمدة 10 دقائق.

واذا كان المسيطر الحراري غير فعال يستعمل الهيتر الصفائحي بدلا عن ذلك.

بعد ذلك يحفظ الانبوب الموجود في البيكر الذي يحتوي الماء عند درجة حرارة 80 س^0 لمدة 20 – 40 دقيقة وذلك بحسب حجم النيماتودا(النيماتودا الاكبر تحتاج وقت أطول). وبعد التثبيت يحفظ الانبوب عند درجة حرارة الغرفة أو في الماء على درجة حرارة 80 م لمدة 20 – 40 دقيقة بالاعتماد على حجم النيماتودا وكبرها (وقت التثبيت اطول من وقت بعد التثبيت).

ملاحظة: أختلاف مستوى الحرارة في برنامج السيطرة الحراري يعتمد على:

- أنتهاء القتل 95 س^0.
- تثبيت الانسجة الطرية Soft 65 س^0.
- تثبيت الانسجة السكلروتينية والصلبة 75 س^0 و 85 س^0.
- التثبيت النهائي وتركيبات الجسم المتصلبة 95 س^0.

المعالجة بالكلسرين Processing in glycerin:

عند وصول الانبوب لدرجة حرارة الغرفة يهز وتنقل المحتويات الى تجويف السلايد المقعر ويشطف جيدا بالماء المقطر عدة مرات ويضاف الماء الى الحاوية . تنقل النيماتودا الى حاوية السلايد المقعر ويوضع معها مزيج من الكلسرين و الماء المقطر بنسبة 20:1 ، يوضع السلايد المقعر الذي يحتوي النيماتودا على هيتر صفائحي على درجة حرارة 70 س^0 لمدة 15- 20 دقيقة . خلال هذه المدة يصبح شكل المزيج يشبه الموجة (محدب) عندها يبدا ناعما عندما يتبخر الماء من المزيج. الان النيماتودا تكون موجودة في الكلسرين اللامائي، ثم يضاف عدة قطرات من الكلسرين اللامائي في حالة كون النيماتودا غير مغطاة بالسائل . ولتلافي حصول انكماش في الانسجة السطحية للنيماتودا ترفع درجة حرارة الهيتر الصفائحي الى 75 – 80 س^0 .

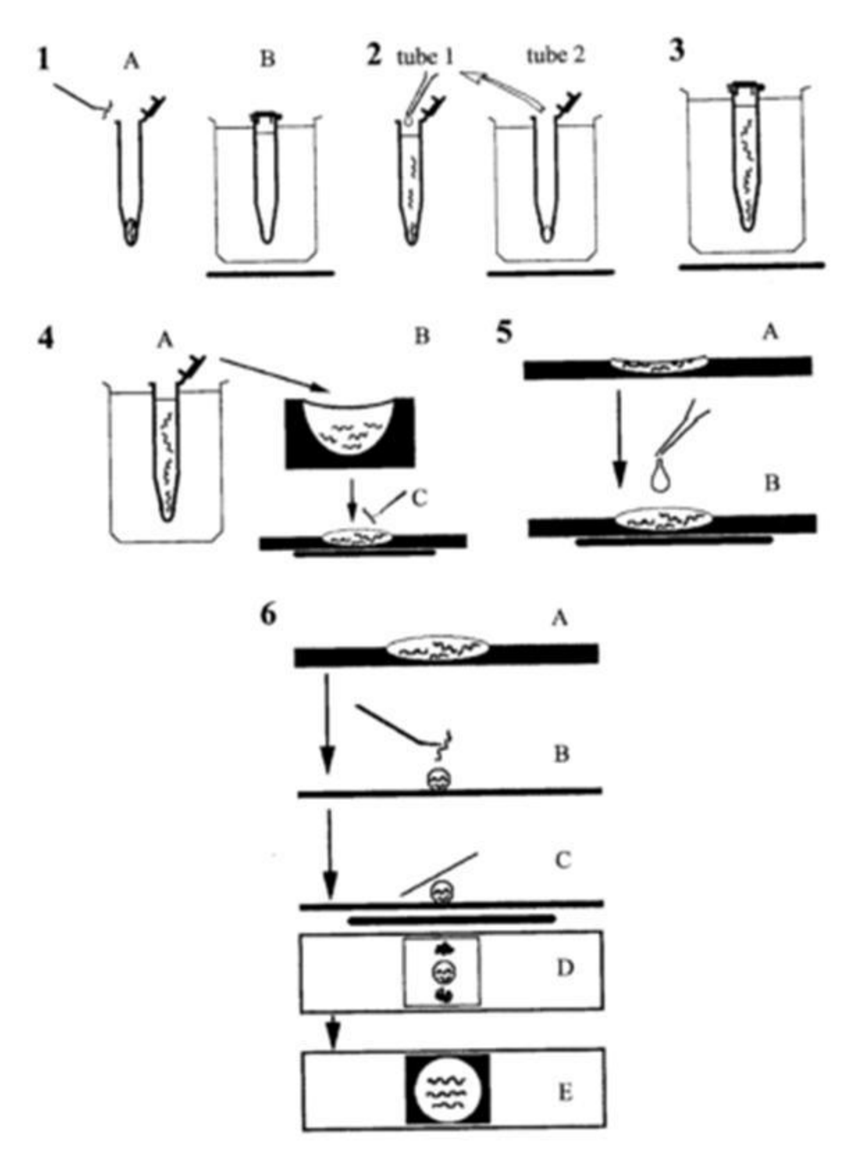
ينقل السلايد ذو التجويف الذي يحتوي النيماتودا 3 - -5 مرات وبصورة سريعة من الهيتر الصفائحي الى درجة حرارة الغرفة ويعاد ثانية الى الهيتر الصفائحي حتى يتشبع جيدا بالكلسرين. عندما نرى تحت المكرسكوب اجزاء جسم النيماتودا متمايزة تماما و واضحة عندها نبدأ بتثبيت السلايد.

ملاحظة مهمة: يتميز الكلسرين كيميائيا عن الكحول بأنه نشط عند الحرارة العالية، وهذا يؤثر في سرعة تحضير السلايد. لاينصح بتعريض السلايد المقعر الى حرارة اكثر من 80 س^0 لمدة اكثر من 30 دقيقة لان الكلسرين يتعرض للتبخر.

رابعا: تحضير السلايد Slide preparation

تحضير السلايد يعتمد اساسا على التقنية القياسية لسلايد الكلسرين:

تنقل النيماتودا مع قطرة من الكلسرين النقي على سلايد زجاجي مع حلقة شمع البرافين (او قطع صغيرة من شمع البرافين) . يغطى النموذج بغطاء سلايد زجاجي. يوضع غطاء السلايد بزاوية مائلة فوق قطرة الكلسرين والنيماتودا ثم توضع قطعتين من شمع البرافين على جانبي الغطاء عند نهايتيه. يوضع السلايد على مصدر حراري في درجة 80 - 85 س^0 حتى سيولته ويحيط الشمع بقطرة الكلسرين وسيولة البارافين تدريجيا تجنبنا تكون فرغات وفقاعات هوائية في السلايد. يكون السلايد جاهز بعد 1 – 1.5 ساعة بعد عملية قتل النيماتودا (شكل 12).



شكل 12. خطوات تحضير الشريحة الدائمة للنيماتودا الممرضة للحشرات EPNs. بحسب Ryss (2003)

بعض الاوساط الغذائية الاصطناعية لتربية النيماتودا الممرضة للحشرات:

النوع الاول :وسط الدجاج

1	Chicken legs	4 legs/ 1000mL
2	Trehalose	1% (10 gm/1000mL
3	Boiled chicken tissues	1% (10gm/1000mL)
4	K_2HPO_4	25mMol (4.35 gm/1000mL)
5	pH	7.5

- تغلى الفقرة 1 لمدة ساعتين (حتى يصبح حساء خفيف)
- تضاف الفقرة 3 الى اعلاه
- يخلط المزيج بالخلاط
- تضاف الفقرة 2 والفقرة 4 الى المزيج اعلاه
- يعقم بال اوتوكليف على درجة 121 س لمدة 15 دقيقة
- يعدل ال PH 7.5

النوع الثاني: الببتون والحليب

ت	المادة	الكمية
1	Peptone	45 g
2	Milk powder	30 g
3	Sodium Chloride, Nacl2	13 g
4	Potassium phosphate,KH2 po4	7.5 g
5	Yolk powder	7.5 g
6	Yeast	3 g
7	Cholesterol	0.15 g
8	Soybean oil	150 ml
9	Lecithin	1.5 g
10	Lard	15 g

تذاب المواد اعلاه في ماء مقطر ثلاث مرات وتعقم قبل الاستعمال

النوع الثالث: اللحم البقري والجلاتين

1 - 3 غرام خلاصة لحم بقري.

2 - تزود ب سكر ثلاثي trehalose 2.5%

3 - يعدل ال PH 7.3

أضافة مادة سائلة غنية بالبروتين والدهون وتزود بكمية من الاوكسجين بحسب معدا نمو النيماتودا

المصادر

بشير، عبد النبي. العسس، خالد و جاويش أماني. 2017. الانتشار الطبيعي لأجناس النيماتودا الممرضة للحشرات في بعض حدائق دمشق وبساتينها وعلاقة ذلك بأهم العوامل البيئية المؤثرة. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 33 (1): 77 – 83.

بشير، عبد النبي. العسس، خالد و جاويش أماني. 2018. تقييم النيماتودا الممرضة للحشرات في المكافحة الحيوية لبعض حشرات التربة: الدودة البيضاء، الديدان السلكية (Coleoptera) الدودة القارضة (Lepidoptera). مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 34 (2): 206 – 211.

الجبوري، أبراهيم جدوع و صبا، جعفر صالح. 2001. أول تسجيل لنيماتودا طفيلية على حفار ساق النخيل ذو القرون الطويلة وحفار عذق النخيل في العراق. مجلة البصرة لابحاث نخلة التمر المجلد 1 (1) : 1- 5.

خلف، محمد زيدان. 2022. الستراتيجيات الامنة بيئيا في كبح حفارات النخيل التي تتبع الجنس *Oryctes*. المؤتمر العربي الثالث عشر لوقاية النبات 16 – 21 تشرين الاول 2022. الحمامات، تونس.

درويشن ،علي. بشير، عبد النبي و العسس، خالد. 2020. تحديد فعالية بعض العزالت المحلية للنيماتودا الممرضة للحشرات ضد حافرة أوراق البندورة/الطماطم *Tuta absoluta* في الحقل وتحت ظروف المختبر. مجلة وقاية النبات العربية. م 38 (4): 318 – 326.

العسس، خالد. أماني جاويش، أسما حيدر وأسماء حسن. 2018 .التقو يم المختبري لكفاءة بعض الوسائط في تخزين النيماتودا الممرضة للحشرات *Heterorhabditis bacteriophora*. مجلة وقاية النبات العربية . 26 (2): 141 – 146.

Agudelo-Silva F, Lindegren JE, Valero KA. 1987. Persistence of *Neoaplectana carpocapsae* (Kapow selection) infectives in almonds under field conditions. *Florida Entomologist.* ;70:288–291. [Google Scholar]

Akhurst R. J and Boemare NE. 1990. Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*, Pp. 75–90 *in* R. Gaugler, and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in Biological Control. Boca Raton: CRC Press. [Google Scholar]

Akhurst R. J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabditis* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*. ;121:303–309. [Google Scholar]

Al-Jboory I. 2007. Survey and identification of the biotic factors in date palm environment and its application for designing IPM-program of date palm pests in Iraq. Aden Univ. J. of Appli & Natural Sci. Vol. 11(3):1-28.

Bari M., A. 1992. Disinfestation of artichoke stumps with entomopathogenic nematode against the artichoke plume moth. *Proceedings of the International Congress of Entomology, Beijing, China.* ;19:319. [Google Scholar]

Bedding R. A, and Akhurst R. J. 1975. A simple baiting technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*. 1975;21:109–110. [Google Scholar]

Bedding, R. A,, Molyneux, A. S. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (*Heterorhabditidae: Nematoda*) *Nematologica*. ;28:354–359. [Google Scholar]

Bedding, R. A. 1988. Storing third stage infective nematode juveniles by mixing with clay, placing between layers of clay or contacting with adsorbent. International Patent WO 88/08668. [Google Scholar]

Bedding, R. A. and Butler KL. 1994. Storage and transport of entomopathogenic nematodes. Australian Patent No. 608852. [Google Scholar]

Bedding,R.A.1981. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica*. ;27:109–114. [Google Scholar]

Beeding, R. A. and Akhurst, R.J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21; 109- 110.

Blaxter, M. L., P. De Ley, J. R. Gary, L. X. Liu, P. Scheldemman and A. Vierstraete. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. Nature, 392(6671): 71-75.

Boemare, N. E., Akhurst, R. J. and Mourant, R. G.1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1993;43:249–255. [Google Scholar]

Boemare,N. E. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Pp. 35–56 *in* R. Gaugler, ed. Entomopathogenic Nematology. Wallingford, UK: CABI Publishing. [Google Scholar]

Bronskill, J. F. 1962. Encapsulation of rhabditoid nematodes in mosquitoes. *Canadian Journal of Zoology.* ;40:1269–1275. [Google Scholar]

Burman, M., Pye, A. E. 1980. *Neoaplectana carpocapsae*: Movements of nematode populations on a thermal gradient. *Experimental Parasitology.* ;48:258–265. [Google Scholar]

Byers, J. A, 1982. Poinar GO., Jr Location of insect hosts by the nematode, *Neoaplectana carpocapsae,* in response to temperature. *Behaviour.* ;79:1–10. [Google Scholar]

Cabanillas, H. E.and Raulston, J.R. 1996. Effects of furrow irrigation on the distribution and infectivity of *Steinernema riobravis* against corn earworm in corn. *Fundamental and Applied Nematology.* ;19:273–281. [Google Scholar]

Capinera, J. L. and Hibbard, B.E. 1987. Bait formulations of chemical and microbial insecticides for suppression of crop-feeding grasshoppers. *Journal of Agricultural Entomology*. ;4:337–344. [Google Scholar]

Carta, L. K. and J. C. Osbrink. 2005. *Rhabditis rainai* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera; Rhinotermitidae). Nematology, 7(6): 863-879.

Ciche, T. 2007. The biology and genome of Heterorhabditis bacteriophora. The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora* (February 20, 2007), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, Doi/10.1895/wormbook.1.135.1, http://www.wormbook.org.

Connick, W. J., Nickle, W. R. and Vinyard, B. T. 1993. Pesta: new granular formulations for *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Nematology*. ;25:198–203. [Google Scholar]

Converse, V. and Miller, R.W.1999. Development of the one-on-one quality assessment assay for entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*. ;74:143–148. [Google Scholar]

Doucet, M. A., Miranda, M. B. and Bertolotti, M. A. 1998. Infectivity of entomogenous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) *Fundamental and Applied Nematology*. ;21:13–16. [Google Scholar]

Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A. Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler. M. and Charles, J.F. 2003. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*. ;21:1307–1313. [Google Scholar]

Dutky, S. R. 1959. Insect Microbiology. *Advances in Applied Microbiology*. ;1:175–200. [Google Scholar]

Dutky, S. R. and Hough, W. S. 1955. Note on a parasitic nematode from codling moth larvae, *Carpocapsae pomonella*. *Proceedings of the Entomological Society of Washington.* ;57:244. [Google Scholar]

Fife, J. P., Derksen, R. C., Ozkan, H. E. and 2003. Grewal PS. Effects of pressure differentials on the viability and infectivity of entomopathogenic nematodes. *Biological Control,* ;27:65–72. [Google Scholar]

Fife, J. P., Derksen, R. C., Ozkan, H. E., Grewal, P. S., Chalmers, J. J. and Krause CR.2004. Evaluation of a contraction flow field on hydrodynamic damage to entomopathogenic nematodes- a biological pest control agent. *Biotechnology and Bioengineering.* ;86:96–107. [Google Scholar]

Fife, J. P., Ozkan, H.E., Derksen, R. C., Grewal, P. S. and Krause, C. R. 2005. Viability of a biological pest control agent through hydraulic nozzles. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers.* ;48:45–54. [Google Scholar]

Floyd, L., and Sunita, S. 2012. Mass production of the beneficial nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and its bacterial symbiont. Indian J. Microbiol. 52(3):316-324.

Floyd, L., III. Inman and S. Sunita. 2012. Mass production of the beneficial nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and its bacterial symbiont. Indian J. Microbiol. 52(3):316-324.

Fodor, A, Séringer, G. and Georgis R. 1989 Application of insect pathogenic nematodes (*Neoaplectana carpocapsae* and *Heterorhabditis* spp.) against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) larvae: Small plot experiments and laboratory trials. *Novenyved.* ;25:215. [Google Scholar]

Friedman, M. J. 1990. Commercial production and development. Pp. 153–172 *in* R. Gaugler, and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in Biological Control. Boca Raton, CRC Press. [Google Scholar]

Gaugler R, Grewal P, Kaya H, Smith-Fiola D. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. *Biological Control*. 2000;17:100–109. [Google Scholar]

Gaugler, R. and Campbell, J. F. 1991. Selection for enhanced host-finding of scarab larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) in an entomopathogenic nematode. *Environmental Entomology*. ;20:700–706. [Google Scholar]

Gaugler, R., Campbell, J. F. and McGuire, T. R. 1989. Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. ;54:363–372. [Google Scholar]

Georgis, R. 1990. Formulation and application technology, pp. 173- 191 in Gaugler, R., H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca raton. FL: CRC Press.

Georgis, R. 1990. Formulation and application technology. Pp. 173–191 *in* R. Gaugler, and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Boca Raton: CRC Press. [Google Scholar]

Georgis, R. and Poinar, G. 1983c. Vertical migration of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae). Journal of Nematology 15:652–654. [Google Scholar]

Georgis, R., Kaya, H. K. and Gaugler ,R. 1991. Effect of steinernematid and heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on non-target arthropods. *Environmental Entomology*. ;20:815–822. [Google Scholar]

Georgis, R., Koppenhöfer, A. M., Lacey, L. A., Bélair, G., Duncan, L. W., Grewal, P. S, Samish, M. Tan, L., Torr, P. 2006.. Succeses and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control*. ;38:103–123. [Google Scholar]

Georgis, R., Poinar, G. O., 1983b. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) *Journal of Nematology*. ;15:329–332. [Google Scholar]

Georgis, R.and Poinar, G.O. 1983 a. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) Journal of Nematology 15:308–311. [Google Scholar]

Glaser, R. W. 1932. Studies on *Neoaplectana glaseri*, a nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica*) *New Jersey Department of Agriculture, Circular*. ;211:1–34. [Google Scholar]

Glaser, R.W. and Fox H. A. 1930. nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.) *Science*. ;71:16–17. [Google Scholar]

Glaser, R.W. and, Farrell CC. 1935. Field experiments with the Japanese beetle and its nematode parasite. *Journal of the New York Entomological Society*. ;43:345–371. [Google Scholar]

Grewal PS, Selvan S, Gaugler R. 1994a. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology*. 1994a;19:245–253. [Google Scholar]

Grewal, P. S., Converse, V. and Georgis, R. 1999. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two ambush foragers (Nematoda: Steinernematidae) *Journal of Invertebrate Pathology*. ;73:40–44. [Google Scholar]

Grewal, P. S., Lewis, E. E., Campbell, J. F. and Gaugler R. 1994b. Host finding behavior as a predictor of foraging strategy for entomopathogenic nematodes. *Parasitology*. ;108:207–215. [Google Scholar]

Grewal, P.S. 2000. Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Management Science*. ;56:401–406. [Google Scholar]

Grewal,P. S., Ehlers, R.U. and Shapiro-Illan, D. I. 2005. Critical issues and research needs for expanding the use of nematodes in biocontrol. Pg. 479–489 *in* P. S. Grewal,

R. U. Ehlers, and D. Shapiro-Ilan, eds. Nematodes as Biocontrol Agents. Wallingford, UK: CABI Publishing. [Google Scholar]

Grunder, J. M., Ehlers, R-U. and Jung, K. 2005. Quality Control of Entomopathogenic Nematodes. COST Action 819, Agrowscope Faw, Wadenswil, Switzerland. [Google Scholar]

Hackett, K.J. and Poinar GO1973. The ability of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae: Rhabditoidea) to infect adult honeybees (*Apis mellifera*, Apidae: Hymenoptera) *American Bee Journal.* ;113:100. [Google Scholar]

Hashmi, S., Hasnmi, G. and Gaugler, R. 1995. Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. *Journal of Invertebrate Pathology.* 66:293–296. [Google Scholar]

Henderson, C. F. and E. W. Tilton. 1955. Tests with acaricides against the brow wheat mite, J. Econ. Entomol 48:157-161.

Jakubowska, M., Tumialis,D., Bocianowski, J. and Roik,K. 2021. Foliar Application of Entomopathogenic Nematodes against Cereal Leaf Beetle Oulema melanopus L. (Coleoptera: Chrysomelidae) on Wheat .Agronomy, 1662.

Jansson, R. K. and Lecrone, S. H. 1994. Application methods for entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) aqueous suspensions versus infected cadavers. *Florida Entomologist.* ;77:281–284. [Google Scholar]

Kaya, H.K. and Nelson, C. E. 1985. Encapsulation of steinernematod and heterorhabditid nematodes with calcium alginate; a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology.* ;14:572–574. [Google Scholar]

Kermarrec, A. and 1985. Mauléon H. Potential noxiousness of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser to the Antillan toad *Bufo*

marinus L. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit (Gent)* ;50:831–838. [Google Scholar]

Khalaf M. Z., Al-Taweel, A. A. (2015). Palm Borers in Iraqi Environment: Species-Damages- Methods of Control. J. of The Blessed Tree, 07(01):54-64.

Khalaf M. Z., Shbar A. K., Al-Seria M. H., Sami R. A., Naher F. H. (2011). Some aspects of biology and control methods of Fruit Stalk Borer *Oryctes elegans* Prell (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Agricultural Science & Technology A 1:142-147.

Khalaf, M. Z., Alrubaei, H. F. and Khudhair, M. W.. 2017. Ecological sound control strategies for suppression of date palm borers *Oryctes* spp. J of Agricultural Science & Technology A7:18-24.

Khalaf, M. Z., H. F. Alrubaei, F. H. Naher and M. Dh. Jumaa. 2016. Biological control of the date palm tree borers, (Coleoptera: Scarabaidae: Dynastinae). Book of proceedings VII International Scientific Agriculture Symposium (Agrosym2016). Jahorina, Bosnia and Herzegovina, October 06-09, 2016: 1561-1566.

Khalaf, M. Z., Tareq, A. M., Naher, F. H. Salman, A. H. and Khalaf , H. S.. 2018. Biological control of the date palm tree borers, (Coleoptera: Scarabaidae: Dynastinae). J. of Pakistan Entomologist, 40 (1):1-6

Kim, T. W., Kim, T. H., Yasunaga-Aoki, C. and Yu, Y. M. 2014. Mass production of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis megidis* by using microsparger gandong strain. J. Fac.Kyushu Univ. 59 (2):283-288.

Kim, T. W., T. H. Kim, C. Yasunaga-Aoki and Y. M. Yu. 2014. Mass production of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis megidis* by using microsparger gandong strain. J. Fac.Kyushu Univ. 59 (2):283-288.

Kiontke, K., Barrière, A., Kolotuev, I., Podbilewicz, B., Sommer, R., Fitch, D.H.A and. 2007. Félix M-A. Trends, Stasis, and Drift in the evolution of nematode vulva development. *Current Biology.* ;17:1925–1937 [Google Scholar]

Koppenhöfer, A.M. and Grewal, P. S. 2005. Interactions with other biological control agents and agrochemicals. Pg. 363–381 *in* P. S. Grewal, R. U. Ehlers, and D. Shapiro-Ilan, eds. Nematodes as Biocontrol Agents. Wallingford, UK, CABI Publishing. [Google Scholar]

Lacy, L. and Georgis, R.. 2012. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production.a J. of Nematol. 44 (2):218-225.

Lacy, L., R. Georgis. 2012. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production.a J. of Nematol. 44 (2):218-225.

Lello, E. R., Patel. M.N. , Matthews, G. A. and. 1996. Wright DJ. Application technology for entomopathogenic nematodes against foliar pests. *Crop Protection.* ;15:567–574. [Google Scholar]

Lewis, E.E., Gaugler, R. and Harrison, R. 1992. Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology.* 105:309–319. [Google Scholar]

Liu, J., Poinar,G. O, and Berry,R.E. 200. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: The impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. *Annual Review of Entomology.* 45:287–306. [PubMed] [Google Scholar]

Manweiler, S. A. 1994. Development of the first cat flea biological control product employing the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. Pp.1005–1012 *in* Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference: Pest and Diseases, Farnham, Surrey: British Crop Protection Council. [Google Scholar]

Menzler-Hokkanen, I. and Hokkanen, H.M.T. 2004. Developing entomopathogenic nematode delivery systems for biological control of oilseed rape pests. *International organization for Biological and integrated control of noxious animals and plants, West Palaearctic Regional Section, Bulletin.* 28:19–22. [Google Scholar]

Miller,R.W. 1989. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*. ;21:574. [Google Scholar]

Milstead, J. E. 1977. The life cycle and pathobiology of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditoidea: Nematoda) in its lepidopteran hosts. Ph.D. dissertation. University of California, Berkeley, 113 pp. [Google Scholar]

Moyle, P. L and Kaya, H. K. 1981. Dispersal and infectivity of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematodae), in sand. *Journal of Nematology*. 1981;13:295–300[Google Scholar]

Mwaniki, K. M., Gatakaa, H. W.,, Mturi, F. N., Chesaro C. R. , Chuma, J. M., Peshu, N. M., Mason, L., Kager,P., Marsh, K., English, M., Berkley, J. A. and Newton, C. R. 2010.An increase in the burden of neonatal admissions to a rural district hospital in Kenya over 19 years.BMC, Public Health. doi: 10.1186/1471-2458-10-591.

Mwaniki, S. W., J. H. Nderitu, F. Olubayo and J. W. kimenju. 2013. Mass production of entomopathogenic nematodes using Silkworm, *Bombyx mori* L. for management of key agricultural pests. 12th KARI Scientific Conference Proceedings 2010: 759-763.

Nguyen,K. B. 2002. Gallery for the Fourth International Congress of Nematology 8-13/6/2002. Entomology & Nematology Department, University of Florida

Padmakumari, A. P., J. S. Prasas, G. Katti and M. Sankar. 2007. *Rhabditis* sp. (*Oscheius* sp.), abiocotrol agent against rice yellow stem borer, *Scirpophaga incertulas.* Inian J. Plant protection. 35(2): 2-28.

Park, H. W., H. H. Kim, S.H. Youn, T. S. Shin, A. L. A. L. Bilgrami, M. R. Cho and C. S. Shin. 2012. Biological control potentials of insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida) for major cruciferous vegetable insect pests. Applied Entomol. Zool. 47(4): 389-397.

Park, H. W., Kim, H. H., Youn, S. H., Shin, T. S., Bilgrami, A. L. Cho, M. R. and Shin, C. S. 2012. Biological control potentials of insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida) for major cruciferous vegetable insect pests. Applied Entomol. Zool. 47(4): 389-397.

Park, H. W., Kim, M. R. Cho, T. J. Kang, S. J. Ahu, S. W. Jeon, A. L. Bilgrami. 2012 Evaluation of biological potentials of *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida) against 10 insect species. Journal Information service System 37:235-239.

Park, H. W., Kim, Y. O., Ha, J., Youn, S. H., Kim, H. H. Bilgrami, A. L. and Shin, C. S. 2011. Effects of Associated bacteria on the pathogenicity and reproduction of the insect parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). Can. J. Microbiol 57:750-758.

Park, H. W., Y. O. Kim, J. Ha, S. H. Youn, H. H. Kim, A. L. Bilgrami and C. S. Shin. 2011. Effects of Associated bacteria on the pathogenicity and reproduction of the insect parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). Can. J. Microbiol 57:750-758.

Pelezer, M. J. and Reid, R. D. 1972. Microbiology, Third Edition. Mc GrawThird Edition. Mc Graw.

Poinar ,G. O. 2011. The Evolutionary History of nematodes. Brill, Leiden, 439 pp. [Google Scholar]

Poinar ,G.O. 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press, Boca Raton. 277 pp. [Google Scholar]

Poinar G,O., 1991. Genetic engineering of nematodes for pest control. Pg. 77–93 *in* K. Maramorosch, ed. Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors. Boca Raton: CRC Press. [Google Scholar]

Poinar GO, Jr, Thomas GM. Significance of *Achromobacter nematophilus* (Achromobactericeae Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp. Steinernematidae) *Parasitology*. 1966;56:385–390. [PubMed] [Google Scholar]

Poinar GO, Jr, Thomas GM. The Nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1967;9:510–514. [Google Scholar]

Poinar GO, Jr, Veremtshuk GV. A new strain of entomopathogenic nematodes and geographical distribution of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida, Steinernematidae) *Zoological Jhurnal*. 1970;49:966–969. [Google Scholar]

Poinar GO., 1978. Generation polymorphism in *Neoaplectana glaseri* Steiner (Steinernematidae: Nematoda), redescribed from *Strigoderma arboricola* (Fab.) (Scarabaeidae: Coleoptera) in North Carolina. *Nematologica*. ;24:105–114. [Google Scholar]

Poinar, G. O, and Brooks, W.M. 1977. Recovery of the entomogenous nematode, *Neoaplectana glaseri* Steiner from a native insect in North Carolina. *International Research Communications System Medical Science*. ;5:473. [Google Scholar]

Poinar, G. O, and Georgis, R. 1990. Characterization and field application of *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88 (Heterorhabditidae: Rhabditida) *Revue de Nématologie*. 13:387–393. [Google Scholar]

Poinar, G. O, Evans, J. S. and Schuster E. 1983. Field test of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae*, for control1983;5:337–342. [Google Scholar]

Poinar, G. O. and P. S. Grewal. 2012. History of Entomopathogenic Nematology. J. of Nematol. 44(2): 153–161.

Poinar, G. O. 1988. A microsporidian parasite of *Neoaplectana glaseri* (Steinernematidae: Rhabditida) *Revue de Nematologie.* ;11:359–361. [Google Scholar]

Poinar, G. O., 1986. Recognition of *Neoaplectana* species (Steinernematidae: Rhabditida) *Proceedings of the Helminthological Society of Washington.* 53:121–129. [Google Scholar]

Poinar, G. O., Hess, R. T and Thomas, G. 1980 b Isolation of defective bacteriophages from *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) *IRCS Medical Science.* ;8:141. [Google Scholar]

Poinar, G. O., Hess, R.T., Lanier, W. Kinney, S. and White,J. H. 1989. Preliminary observations of a bacteriophage infecting *Xenorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) *Experientia.* 1989;45:191–192. [PubMed] [Google Scholar]

Poinar, G.O and Hom, A. 1986. Survival and horizontal movement of infective stage *Neoaplectana carpocapsae* in the field. *Journal of Nematology.* 1986;18:34–36 [Google Scholar]

Poinar, G.O. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Pg. 23–61 in R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Boca Raton: CRC Press. [Google Scholar]

Poinar, G.O., Ferro, C. and Morales A. 1993. Tesh RB. *Anandranema phlebotophaga* n.gen., n.sp. (Allantonematidae: Tylenchida), a new nematode parasite of phlebotomine sand flies (Psychodidae: Diptera) with notes on experimental infections of these insects with parasitic rhabditoids. *Fundamental and Applied Nematology.* ;16:11–16. [Google Scholar]

Püntener, W. 1981. Manual for field trials in plant protection second edition. Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited.

Reed, E.M, and Wallace, H.R. 1965. Leaping locomotion by an insect-parasitic nematode. *Nature.* ;206:210–211. [Google Scholar]

Richter,S. 1993. Phoretic association between between the dauer juveniles os *Rhabditis stammeri* and life history stages of the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* (Coleoptera: Silphidae). Nematologica, 39(1-4): 346 – 355.

Rovesti, L. and Deseö, K.V. 1989. Effect of neem kernal extract on steinernematod and heterorhabditid nematodes. *Nematologica.* 1989;35:493–496. [Google Scholar]

Rovesti, L. and Deseö, K.V. 1990. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenice nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *Steinernema feltiae* (Nematoda, Steinernematodae) *Nematologica.* 36:237–245. [Google Scholar]

Ryss, A. Y.2003. Express technique to prepare permanent collection slide of nematode. Zoosystematica Rossica,11 (2) 2002:257-260.

Sajnaga, E. and Kazimierczak, W. 2020. Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: an overview. Symbiosis , 80:1–13.

Samish, M., Glazer, I. 1991. Killing ticks with parasitic nematodes of insects. *Journal of Invertebrate Pathology.* ;58:281–282. [Google Scholar]

Sandhu, S. K. and Jagdale, G. B. 2006. Hogenhout SA, Grewal PS. Comparative analysis of the expressed genome of the infective juvenile entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Molecular Biochemistry and Parasitology.* ;145:239–244. [Google Scholar]

Schulte, F. 1989. The association between *Rhabditis nectomena*Sudhaus & Schutle, 1989 (Nematoda: Rhabditidae) and native and introduced millipedes in South Australia. Nematologica, 35(1): 82-89.

Shapiro-Ilan, D. I. Lewis. E.E., Behle, R.W. and McGuires, M. R. 2001. Formulation of entomopathogenic nematode-infected cadavers. *Journal of Invertebrate Patholology*. ;78:17–23. [Google Scholar]

Shapiro-Ilan, D., Han, R. and Dolinksi, C. 2012. Entomopathogenic Nematode

Shetlar DJ. 1999. Application methods in different cropping systems. Pg. 31–36 *in* S. Polavarapu, ed. Procedings of the National Workshop on optimal use of insecticidal nematodes in pest management. Chatsworth, NJ: Rutgers University. [Google Scholar]

Silver, S. C. and Dunlop,D. B and Grove, D.I. 1995. Granular formulation of biological entities with improved storage stability. International Patent No. WO 95/05077. [Google Scholar]

Silverman, J., Platzer, E.G and Rust, M.K. 1982. Infection of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Bouche) by *Neoaplectana carpocapsae* Weiser. *Journal of Nematology*. 1982;14:394–397. [Google Scholar]

Simon,S., and Poinar, F. O. 1973. The ability of *Neoaplectana carpocapsae* (Steinernematidae: Nematodea) to survive extended periods of desiccation. *Journal of Insect Pathology*. ;22:228–230. [Google Scholar]

Smart, G. C. 1995. Viewpoint entomopathogenic nematodes for biological control of insects. J. of Nematol. 27 (4S):529-534.

Smart, G. C. and K. B. Nguyen. 1994. *Rhabditis Pheropsophi* (Rhabditida: Rhabditidae). J. Nematol. 26(1): 19-24.

Steiner, G. 1923. *Aplectana kraussei* n. sp., einer in der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematodenform, nebst Bemerkungen über das Seitenorgan der

parasitischen nematoden. *Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene.* ;59:14–18. [Google Scholar]

Steiner, G. 1929. *Neoaplectana glaseri* n. g., n. sp. (Oxyuridae) a new nemic parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.) *Journal of the Washington Academy of Science.* ;19:436–440. [Google Scholar]

Steyn, W. P., Daneel , M. S. and Malan, A. P. 2019. Field application of entomopathogenic nematodes against *Thaumatotibia leucotreta* in South African avocado, litchi and macadamia orchards. BioControl, 64: 401 – 411.

Stock, S. P., A. M. Caiceda and P. A. Calatayud. 2005. *Rhabditis (Oscheius) Colombiana* (Nematoda: Rhabditidae), a necromenic associate of the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) from Cauca Valley, Colombia. Nematology, 7(3): 417-373.

Stock, S.P. and Hunt, D. J. 2005. Morphology and systematics of Nematodes used in Biocontrol. *In* Grewal, P. S., Ehlers, R-U., and Shapiro-Ilan, D. I. Nematodes as biocontrol agents. Wallingford: CABI Publishing. [Google Scholar]

Sudhaus, W. and F. Schulte. 1989. *Rhabditis necromena* (Nematoda: Rhabditidae) from South Australian diplopoda with notes on its sibling *Rhabditis myriophila* poinar, 1986 and *Rhabditis caulleryi* Manupas. Nematologica, 35(1): 15-24.

Sudhaus, W. and Schulte, F. 1989. *Rhabditis necromena* (Nematoda: Rhabditidae) from South Australian diplopoda with notes on its sibling *Rhabditis myriophila* poinar, 1986 and *Rhabditis caulleryi* Manupas. Nematologica, 35(1): 15-24.

Temesgen, A., D. and Dangila, Ä. 2016. Life history traits of entomopathogenic nematodes of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora*. MSc Thises, Universität zu Kiel, 113 p.

Thomas, G. M. and Poinar, G. O.1979. Jr *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*. ;29:352–360. [Google Scholar]

Timmeren, S.V., C.J. Wise and R. Isaacs, 2012. Soil application of neonicotinoid insecticide for control insect pests in Wine grape, published online in Wiley online library. Pest Mang. Sci., 68:537-542.

Toepfer, S., Knuth,P., Glas, M. and Kuhlmann, U. 2012. Successful application of entomopathogenic nematodes for the biological control of western corn rootworm larvae in Europe. Proceedings International Conference on the German Diabrotica Research Program, November 14-16, 2012, Berlin, Germany.

Veremchuk, G.V and Issi,I.V. 1970. The development of microsporidians of insects in the entomopathogenic nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematodiae) *Parazitologiya*. ;4:3–7. [Google Scholar]

Webster, J. M. and Bronskill, J.F. 1968. Use of Gelgard M and an evaporation retardant to facilitate control of larch sawfly by a nematode-bacterium complex. *Journal of Economic Entomology*. ;61:1370–1371. [Google Scholar]

Webster, J.M., Chen, G. Hu, K. and Li, J. 2002. Bacterial metabolites. Pp. 99–114 *in* R. Gaugler, ed. Entomopathogenic Nematology. Oxon, UK: CAB International. [Google Scholar]

Weiser, J. 1955. ,*Neoaplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillata, Steinernematidae) novy cizopasnik housenek obalece jablecneho, *Carpocapsae pomonella* L. *Vestnik Ceskoslovenske Spolecnosti Zoologicke*. ;19:44–52. [Google Scholar]

Weiss, M.,Glazer, I., Mumcuoglu, K.Y., Elking, Y. and Galun, R. 1993. Infectivity of steinernematid and heterorhabditid nematodes for the human body louse *Pediculus humanus hunanus* (Anoplura: Pediculidae) *Fundamental and Applied Nematology*. 1993;16:489–493. [Google Scholar]

Welch, H. E., Bronskill, J. F. 1962. Parasitism of mosquito larvae by the nematode, DD-136 (Nematoda: Neoaplectanidae) *Canadian Journal of Zoology*. ;40:1263–1268. [Google Scholar]

White,G. F. 1972. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66: 302-303.

Wilson, M. J., D. M. Glen, S. K. George, and R. C. Butler. 1993. Mass cultivation and storage of Rhabditid Nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*, abiocontrol agent for slige. Biocontrol Sci. Technol. 3(4): 513-521.

Woodring, J. L. and Kaya, H. K. 1988. *Steinernematid* and *Heterorhabditid* nematodes. A handbook of techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331.

Wright, L.C, 1993. Witkowski JF, Echtenkamp G, Georgis R. Efficacy and persistence of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) applied through center-pivot irrigation system against larval corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae) *Journal of Economic Entomology*. ;86:148–1354. [Google Scholar]

Wright, P. J. 1990. Morphological characterization of the entomogenous nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Rhabditida) *New Zealand of Zoology*. ;17:577–586. [Google Scholar]